



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Pedro Vinícius Barbosa da Conceição Pires

**DELEÇÕES SELETIVAS PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO
MÍNIMO DO PEPTÍDEO Hs02 COM MANUTENÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Trabalho de conclusão de curso

Brasília – DF

2º/2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Pedro Vinícius Barbosa da Conceição Pires

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÍNIMO DO PEPTÍDEO Hs02 COM
MANUTENÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Trabalho de Conclusão de Curso em Química Tecnológica apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador(a):): Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
2º/2018

“Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento.”
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Quando olho para trás e penso em todo que se passou eu sinto a sensação de dever concluído. Esse trabalho representa o fim de mais uma etapa em minha vida e não consigo sentir outra coisa a não ser o orgulho de conseguir trilhar esse caminho que sempre foi o meu sonho e gratidão por todas as pessoas que o tornaram possível.

Quero agradecer primeiramente minha família. Minha mãe Patrícia, por sempre apoiar minhas escolhas, desde pequeno, quando disse que queria ser um cientista. Me dando livros, alimentando minha imaginação com histórias, e me estimulando sempre, ainda lembro quando a senhora me deu um microscópio e o kit “Alquimia”, foram as coisas mais divertidas da vida. A os meus avós Roque e Adei, que também me criaram e a todo momento me deram o apoio. Seja para ensinando a ler, a jogar futebol (mesmo que eu não seja bom), a fazer os deveres do Kumon ou para me falar para fazer caminhada no condomínio, sei que vocês sempre pensaram no melhor para mim. Ao meu Pai Jansen, que tem uma cabeça tão louca quanto a minha e me ensinou a ter um olhar no futuro e não deixar que falem que algo é impossível, só por que ainda não foi feito. E aos meus irmãos Bianca e Estevão, que me aguentam, mesmo eu sendo a pessoa mais chata do mundo, sempre questionando tudo.

Tenho que agradecer a Professora Aline Lima de Oliveira que, sem sua recomendação não teria conhecido o meu orientador.

Agradeço Professor Guilherme Dotto Brand, que me aceitou em sua equipe, mesmo sem me conhecer. Por acreditar em minha capacidade e idealizar um projeto que acredito ter muito potencial. Por instigar uma vez mais minha vontade de aprender, de investigar, de questionar, de acreditar que eu havia perdido nos últimos semestres do curso, que acabam cobrando tanto de nossa saúde mental. Obrigado por me lembrar o por que ter escolhido esse curso. Obrigado por ser um excelente orientador, calmo, aberto ao diálogo, solícito e por incentivar um ambiente colaborativo no LBAS, que permite o crescimento de todos.

Agradeço os meus amigos, que me ajudaram em minhas crises de ansiedade, que ajudaram a manter a sanidade nos momento mais difíceis e não me deixaram entrar em inércia quando a única vontade era de sumir. Arthus Okada, que sempre me acolheu e para mim representa um abrigo. Carlos Moretti, um companheiro que por mais estranho que seja, sempre dá os mais sábios conselhos. Rodrigo Nunes, que tem a função de sempre reclamar

mais alto que todo mundo, mas também transmite a segurança e ter os pés no chão. A Marina Nunes Pessoa, minha amiga, confidente e companheira, que acompanhou mais de perto todo o processo e sabe quantos fios de cabelos arranquei e quantas vezes comemorei durante todo esse projeto.

Agradeço a todos a quem tive a honra de dividir a bancada e que me auxiliaram em todo o tipo de problema que aparecesse. Ao Samuel Costa, por me ensinar as técnicas de síntese. Ao Eder Alves Barbosa, por sempre sanar minhas dúvidas quando o Guilherme não estava. Ao João Bueno, por colaborar durante as sínteses. Ao José Brango, por sempre estar disposto a ajudar quando eu precisava. A Diana, Robson, Terezinha, Charley, por me orientarem quando estava perdido. A Michele Avilla, pelas colaborações. A Andreanne Gomes, por me ensinar a utilizar o HPLC.

Agradeço aos professores José Roberto de Souza do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, FM-UnB e o Professor Marcelo Ramada do Laboratório de Análise de Biomoléculas da Pós-graduação da Universidade Católica de Brasília. Sem a colaboração entre os laboratórios esse trabalho não haveria saído.

A todos que colaboraram para que esse trabalho fosse possível, mesmo que minha memória tenha me falhado, à vocês tem os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. Introdução Teórica.....	122
1.1. Peptídeos Antimicrobianos.....	12
1.1.1. Estruturas Peptídicas.....	12
1.1.1.1 Estrutura Primária.....	13
1.1.1.2 Estrutura Secundária.....	13
1.2. Desenvolvimento de novos AMPs	14
1.3. Propriedades físico-químicas de AMPs.....	17
1.3.1. Carga.....	17
1.3.2. Conformação.....	18
1.3.3. Anfifilicidade, hidrofobicidade e ângulo polar.....	18
1.3.4. Comprimento.....	19
1.4. Mecanismo.....	20
1.5. Interesses e desafios: trabalhando com o Hs02	22
2. Objetivos.....	25
2.1. Geral	25
2.2. Específico	25
3. Métodos	26
3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida.....	26
3.1.1. Preparação da síntese.....	26
3.1.2. Desproteção.....	27
3.1.3. Acoplamento.....	28
3.1.4. Teste de Kaiser.....	29
3.1.4.1 “Capping”	29
3.1.5. Clivagem.....	30
3.2. Purificação de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência	30
3.3. Análise dos peptídeos por espectrometria de massa.....	31
3.4. Quantificação.....	31
3.5. Determinação de concentração inibitória mínima	32

4. Resultados e Discussão.....	34
4.1. Síntese de peptídeos.....	34
4.2. Purificação dos peptídeos e caracterização da estrutura primária	35
4.3. Quantificação.....	42
4.4. Determinação da atividade antimicrobiana dos análogos de Hs02	43
5. Conclusões.....	46
6. Referências	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

APD – Antimicrobial Peptide Database (Database de Peptídeos Antimicrobianos, em português)

AMPs – Antimicrobial Peptides (peptídeos antimicrobianos, em português)

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (instituto de padrões clínicos e laboratoriais, em português)

DCM – Diclorometano

DIC – N,N' - diisopropilcarbodiimida

DIPEA – N,N'-diisopropiletilamina

DMF – Dimetilformamida

Fmoc – 9-fluorenilmetoxycarbonil

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em português)

IAP – Intragenic Antimicrobial Peptide (Peptídeo Antimicrobiano Intragênico, em português)

MALDI-TOF – Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight (Dessorção/ionização a laser assistida por matriz – tempo de voo, em português)

MIC – Minimum Inhibitory Concentration (concentração inibitória mínima, em português)

OMS – Organização Mundial da saúde

Oxyma Pure – acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)

QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship (relação quantitativa de estrutura-atividade, em português)

SPPS – Solid Phase Peptide Synthesis (Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, em português)

TFA - Trifluoroacetic Acid (ácido trifluoro acético, em português)

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Símbolo de três letras	Símbolo de uma letra	Carga isotópica
Alanina	Ala	A	71,037
Cisteína	Cys	C	103,009
Ácido aspártico	Asp	D	115,026
Ácido Glutâmico	Glu	E	129,042
Fenilalanina	Phe	F	147,068
Glicina	Gly	G	57,021
Histidina	His	H	137,058
Isoleucina	Iso	I	113,084
Lisina	Lys	K	128,094
Leucina	Leu	L	113,084
Metionina	Met	M	131,04
Asparagina	Asn	N	114,042
Prolina	Pro	P	97,052
Glutamina	Glu	Q	128,058
Arginina	Arg	R	156,101
Serina	Ser	S	87,032
Treonina	Thr	T	101,047
Valina	Val	V	99,068
Triptofano	Trp	W	186,079
Tironisa	Tyr	Y	163,063

RESUMO

O crescente número de microrganismos multirresistentes a antibióticos é uma das maiores ameaças do século, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) despontam como uma alternativa auspiciosa por conta de sua forma de ação que permite ter atividade contra os mais diversos organismos e havendo poucos relatos de casos de resistência. Potentes AMPs podem ser encontrados em diversas espécies de animais e plantas, permitindo o desenvolvimento de vastas bibliotecas sendo que uma das formas de identificar novas moléculas é por meio da varredura de sequências encriptadas em proteínas. Contudo, grande parte dos peptídeos naturais não são atrativos do ponto de vista econômico, principalmente, por serem muito extensos, inviabilizando a sua produção em escala comercial. A indústria tem investido esforços na otimização de sequências peptídicas, removendo resíduos redundantes e/ou obsoletos na procura de AMPs sintéticos menores, mais potentes e – consequentemente – mais baratos. O peptídeo Hs02 é um peptídeo antimicrobiano intragênico (IAP) potente e de amplo espectro que apresenta 16 resíduos de aminoácidos, o que nos levou a investigar o tamanho mínimo dessa sequência peptídica, por meio da redução nas porções *N*-, *C*-terminais. Os três análogos – chamados de Hs02 13.1, 13.2 e 10.0 – foram sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sequenciados por espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e tiveram sua atividade caracterizada por testes de concentração inibitória mínima (MIC) em culturas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. neoformans*. Os análogos 13.1 e 13.2 ainda apresentaram potencial antimicrobiano, enquanto o 10.0 não possui atividade nas concentrações estudadas. Apresentando o MIC maior que o peptídeo original, pode-se inferir que o Hs02 já se encontra em um tamanho ótimo para ação antimicrobiana, contudo ainda é necessária a investigação destes análogos como agentes anti-inflamatórios.

Palavras-chaves: Peptídeo / Antimicrobiano / Indústria.

ABSTRACT

The rise of multiresistant microorganisms to conventional antibiotics is one of the greatest threats of the century, increasing the need for novel therapeutic agents. Antimicrobial peptides (AMPs) appear as an auspicious alternative due to their mode of action, which allows them to be active against diverse microorganisms with few reported cases of resistance. Potent AMPs can be found in various species of animals and plants, allowing the development of vast libraries. A novel methodology to identify new molecules is by mining proteins for encrypted sequences. However, most of the natural peptides are not attractive from an economic point of view, mainly because they are long, turning their synthesis impractical on a commercial scale. The industry has invested in optimizing peptide sequences, removing redundant and/or obsolete residues in the search for smaller, more potent, and consequently cheaper, synthetic AMPs. The Hs02 peptide is a potent, broad-spectrum intragenic antimicrobial peptide (IAP), which led us to investigate the minimum size of this peptide sequence by reducing the N-, C-terminal portions. The three analogs - called Hs02 13.1, 13.2 and 10.0 - were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by high performance liquid chromatography (HPLC), sequenced by mass spectrometry (MALDI-TOF / TOF) and their activity was characterized by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) in cultures of *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. neoformans*. Analogues 13.1 and 13.2 still presented antimicrobial potential, while 10.0 had no activity at the concentrations studied. By presenting higher MICs than the original peptide, it is possible to infer that Hs02 is already in an optimal size, however the analogs should still be investigated as anti-inflammatory agents.

Key-words: Peptide / Antimicrobial / Industry.

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Peptídeos Antimicrobianos

O contínuo aparecimento de microrganismos resistentes a antibióticos convencionais é um dos maiores desafios da atualidade e o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês antimicrobial peptides) tem ganhado cada vez mais espaço, voltando a ser uma alternativa viável para combatê-los (Fox, 2013). Remédios como Cubicin[®], Colistina, Cpd86, MOD-6030, Lupron[™], e ZPGG-72 são todos exemplos de AMPs que estão em fases de testes clínicos ou já são aprovados para uso comercial (Zasloff, 2002)(Fosgerau e Hoffmann, 2015).

Os AMPs são umas das mais primitivas formas de defesa do sistema imune e sua persistência evolutiva em plantas e animais mostra a sua eficácia contra microrganismos invasores (Zasloff, 2002). É difícil encontrar uma resistência generalizada a peptídeos, isso se deve aos diferentes alvos (hidrofóbicos e aniônicos) o qual os AMPs atuam (Fjell *et al.*, 2012).

A estrutura de um peptídeo é composta de duas extremidades: o N-terminal, onde se encontra o grupo amino, e o C-terminal, onde se encontra o grupo carboxila (Vranken, Van e Weiss, 2013). Essa cadeia linear pode apresentar características/propriedades físico-químicas muito diferentes dependendo sequência de aminoácidos que a compõem. Segundo Powers e Hancock (2003), idealmente, AMPs possuem menos de 50 resíduos de aminoácido, em geral, carregados positivamente e com uma porção significativa hidrofóbica, para que se estruture em uma conformação anfifílica quando em contato com a membrana de microrganismos.

1.1.1. Estruturas peptídicas

A estrutura peptídica está intimamente ligada a sua função. Existem diferentes níveis estruturais que podem ser conceituados com diferentes hierarquias: a primária (sequência dos aminoácidos), a secundária (conformação espacial da cadeia), a terciária (interações intramoleculares de aminoácidos distantes), e a quaternária (interações intermoleculares de

cadeias distintas)(Nelson e Cox, 2013). No caso dos peptídeos, tem-se particular interesse nos dois primeiros, a estrutura primária e a estrutura secundária. Através delas conseguimos derivar suas propriedades físico-químicas.

1.1.1.1. Estrutura Primária

A estrutura primária é a sequência dos resíduos de aminoácido ligados covalentemente na forma de uma cadeia polipeptídica. Neste caso, o que é observado unicamente é a posição dos resíduos de aminoácidos de forma linear (Nelson e Cox, 2013), sem considerar a sua conformação espacial.

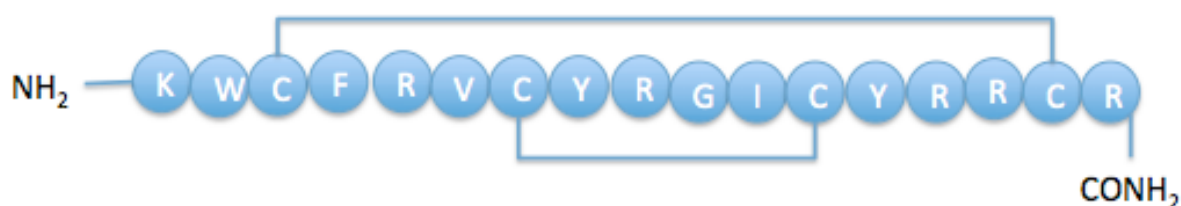


Figura 1. Estrutura primária do tachyplesin. Retirado e adaptado de Nakamura *et al.*, 1988.

1.1.1.2. Estrutura secundária

A estrutura secundária trata do arranjo espacial adotado pela estrutura peptídica (Nelson e Cox, 2013). Diferentemente das inúmeras estruturas primárias possíveis, os peptídeos tendem a convergir quanto a sua distribuição no espaço, podendo ser divididos em três grandes grupos: α -hélice, folha β e estendido (desestruturado) (Powers e Hancock, 2003)(Fig. 2).

Peptídeos com a estrutura em α -hélice são amplamente estudados devido a considerável quantidade de AMPs naturais que apresentam tal estrutura (Ong, Wiradharma e Yang, 2014). Para que haja a formação da estrutura em α -hélice é necessário que haja uma ligação de hidrogênio intramoleculares com uma periodicidade igual a $i \rightarrow i + x$, sendo $x = 3$ ou 4 (Vranken, Van e Weiss, 2013). Assim, há o dobramento característicos dos peptídeos antimicrobianos em α -hélice e a formação de duas faces, uma catiônica e outra hidrofóbica, imperativo para a interação com a membrana.

AMPs em folha β também são encontrados naturalmente e temos como exemplo o tachyplesin, isolado do limulidae japonês, *Tachyplesus tridentatus* (Nakamura *et al.*, 1988). A conformação β é uma distribuição mais alongada onde a cadeia lateral de um resíduo de aminoácido se encontra oposta a outra, formando um “zigue-zague”, quando há mais de um

segmento paralelo é que temos a folha β (Nelson e Cox, 2013). As folhas β são estabilizadas por ligações de hidrogênio ou ligação de dissulfeto e podem ser paralelas ou anti-paralelas, sendo que a segunda é mais comum por conta do ângulo das ligações de hidrogênio que as estabilizam.

Peptídeos estendidos se diferem por não possuírem uma estrutura secundária definida, normalmente por conta da alta quantidade de aminoácidos que não favorecem a formação em hélice ou a conformação β (glicina e prolina) (Powers e Hancock, 2003; Vranken, Van e Weiss, 2013). As interações com a membrana lipídica são do tipo Van der Waals.

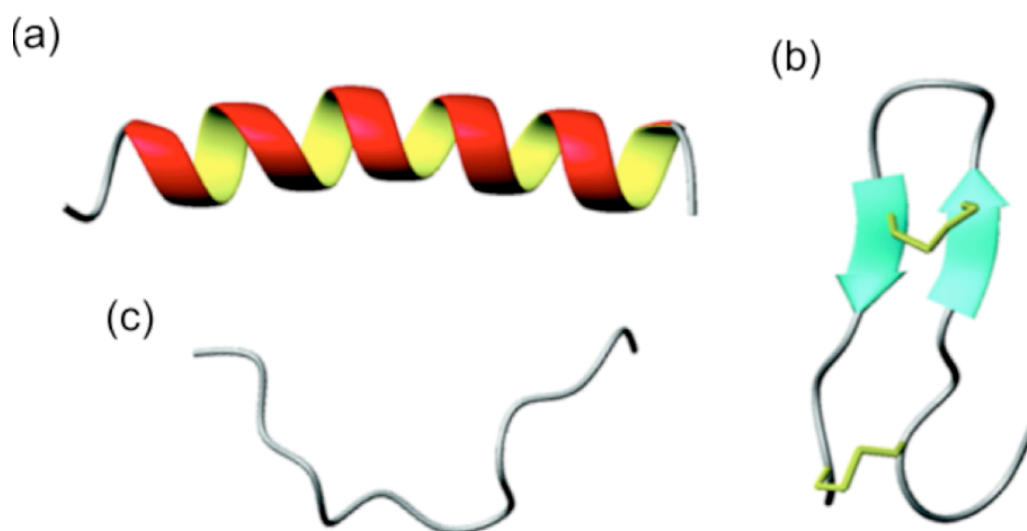


Figura 2. Grupos de estruturas secundárias: (a) α -hélice, (b) folha β e (c) estendido. Imagem retirada e adaptada de Ong, Wiradharma e Yang, 2014.

1.2.Desenvolvimento de novos AMPs

Peptídeos com capacidade antimicrobiana tem obtido uma posição de destaque na indústria farmacêutica por serem seletivos, possuírem metabolismo previsível, um protocolo de síntese bem definido e boa eficiência contra os “Superbugs” (organismos multirresistentes a antibióticos convencionais). Diversos peptídeos com potencial antimicrobiano foram isolados de fontes naturais, caracterizados e classificados; não sendo difícil encontrar bases de dados pela internet com informações dessas moléculas, como o “APD-Antimicrobial Peptide Database” (Database de Peptídeos Antimicrobianos, em português) (disponível em <http://aps.unmc.edu/AP/main.html>). Contudo, com a proliferação dos “*Superbugs*” – uma das dez maiores ameaças globais para a saúde no ano de 2019, segundo o site da OMS

(<https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>) – ainda se faz necessário a prospecção e desenvolvimento de AMPs adequados para a utilização em escala industrial (Uhlig *et al.*, 2014).

Em seu trabalho de revisão Ong, Wiradharma e Yang (2014) abordam as estratégias mais utilizadas atualmente para o desenvolvimento de novos AMPs, sendo elas: a modificação de modelo, minimalista ou “novo design” e a bioinformática.

A modificação de modelo tem como base peptídeos encontrados naturalmente e que possuem alguma atividade próxima com a de interesse e assim obtendo importantes informações sobre a relação estrutura-função. Estratégias como o truncamento de sequências, substituição pontuais de aminoácidos, hibridização e ciclização são algumas das estratégias abordadas no trabalho, a fim de evitar redundâncias e aprimorar suas características.

Como exemplo dessa abordagem temos o trabalho com o AMP LL-37, peptídeo derivado da catelicidina humana (Ciornei *et al.*, 2005). Nesse artigo Ciornei e colaboradores procuram por opções para diminuir a sua toxicidade por meio do truncamento de sequências nas porções *N*- e *C*- terminais, sem que prejudique a sua atividade antimicrobiana. Dos análogos sintetizados dois (Fr-106 e Fr110) – que tiveram a retirada de 2 e 6 resíduos na porção *N*-terminal, respectivamente – tiveram concentração inibitória mínima (MIC) comparável ao peptídeo original e uma taxa de hemólise até duas vezes mais baixa, quando em maiores concentrações.

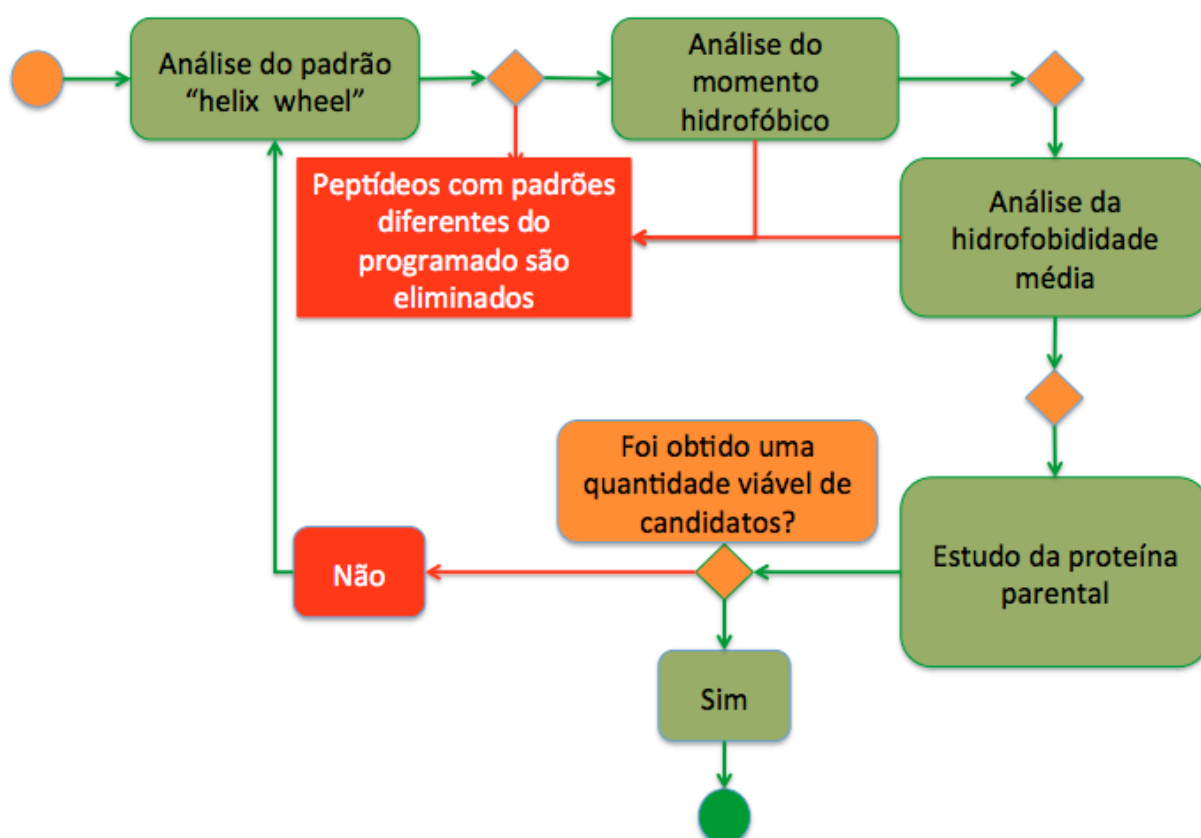
O modelo minimalista apresenta uma nova forma de se estudar AMPs. A sua premissa é que para obter um peptídeo com atividade desejada é necessário abordar apenas a anfifilicidade, carga e estrutura secundária. As demais características são apenas acessórias. Dessa forma, é possível desenvolver peptídeos com alto potencial antimicrobiano utilizando apenas 3 ou 4 tipos de aminoácidos, podendo ser: Arg, Lys e His por serem positivamente carregados e os não polares Ala, Val, Leu, Phe, Tyr e Trp (Strøm, Rekdal e Svendsen, 2002).

Por fim, temos a utilização de instrumentos de bioinformática para a predição da atividade peptídica. Uma das abordagens mais amplamente utilizadas é chamada relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR, do inglês quantitative structure-activity relationship) a qual procura correlacionar parâmetros moleculares com a sua atividade (Cherkasov *et al.*, 2009).

Das abordagens para a prospecção de AMPs, a busca intragênica para a seleção de novos candidatos é ainda pouco explorada. Por estarem codificados em proteínas, a não ser

que o seu mecanismo seja conhecido – como o da bradicinina (Sharma, 2009) – é necessário um instrumento com caráter exploratório. O Kamal (software desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, chefiado pelo Prof. Dr. Carlos Bloch Jr., ainda não disponível ao público) tem como função identificar possíveis AMPs encriptados em proteínas a partir de suas características físico-químicas comparadas a parâmetros previamente programados (Brand *et al.*, 2018; Ramada *et al.*, 2017).

Sendo uma técnica de prospecção *in silico*, Brand e colaboradores apresentam uma metodologia diferente da já estabelecida no meio científico. Ao considerar que diferentes AMPs podem atuar de forma similar, então também é possível inferir que possuam características parecidas. O Kamal procura diretamente no genoma da espécie de interesse e identifica pequenos segmentos proteicos similares a AMPs. Ao selecionar as características, o programa retorna possíveis candidatos, os quais poderão ser sintetizados, caracterizados e os dados são repassados ao software, refinando o processo, como mostrado no esquema a seguir.



Esquema 1. Análise de resultados apresentados pelo Kamal. Adaptado de Sá, 2018.

1.3. Propriedades físico-químicas de AMPs

Peptídeos antimicrobianos tendem a interagir com membranas (Powers e Hancock, 2003). Diferentemente dos antibióticos convencionais, a sua ação não está ligada a receptores específicos, mas sim a múltiplos alvos hidrofóbicos e/ou aniônicos, conferindo a sua diversidade e certo grau de seletividade (Fjell *et al.*, 2012). A aproximação entre AMPs e membranas é guiada por interações eletroestáticas e é regida pelas propriedades físico-químicas do peptídeo.

Diferente a algumas linhas de pesquisa, como as mostradas no trabalho de revisão Ong, Wiradharma e Yang (2014); Brand (2007) em sua tese de doutorado sugere que os parâmetros físico-químicos dos AMPs devem ser estudados conjuntamente, pois é a sua união que determinará sua atividade. Esses parâmetros são: carga, conformação, anfifilicidade, hidrofobicidade e ângulo polar, conforme na figura a seguir.

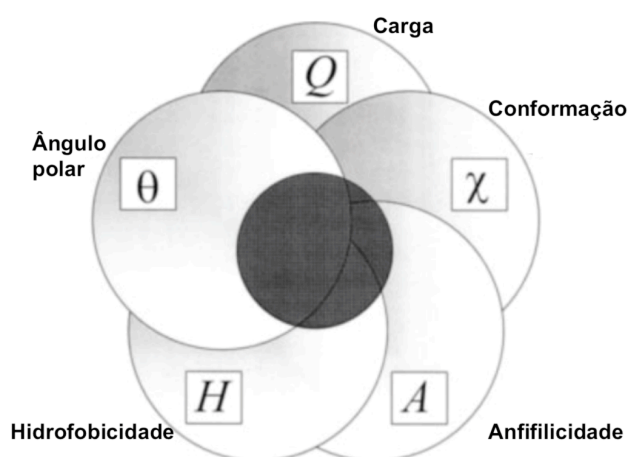


Figura 3. Interdependência entre os fatores físico-químicos para a atividade de peptídeos antimicrobianos. Retirado e traduzido de (Yeaman, 2003).

1.3.1. Carga

Uma das primeiras características a ser observada é a carga líquida do peptídeo. Os peptídeos em geral possuem carga positiva e o seu caráter catiônico é importante para que haja a interação inicial com a membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que possuem caráter aniônico (Joo, Fu e Otto, 2016). No APD (Antimicrobial Peptide Database) a grande maioria dos AMPs são carregados positivamente com uma média de + 4,6, contudo, embora incomuns, existem exemplos de peptídeos antimicrobianos com cargas negativas, os quais usualmente apresentem resíduos de Asp em sua cadeia (Wang, 2004). Sendo assim é

nítido que não há uma relação direta carga-função, mesmo que exista uma maior concentração com peptídeos com carga entre +4 e +6.

1.3.2. Conformação

Como exposto anteriormente, os peptídeos podem variar amplamente em relação a sua estrutura primária, contudo tendem a convergir em conformações específicas que podem se divididas em grupos, sendo os em α -hélice e folha β os mais estudados (Powers e Hancock, 2003)(Nelson e Cox, 2013).

Os peptídeos em α -hélice dependem do meio em que está solvatado, adotando conformações aleatórias em solução aquosa e estruturando quando interagem com a membrana e/ou moléculas biomiméticas. Para que um peptídeo atravessasse a camada lipídica são necessários aproximadamente 21 aminoácidos (ou sete voltas da hélice) que é uma quantidade comum de resíduos em peptídeos transmembrana (Vranken, Van e Weiss, 2013).

AMPs em conformação β , em geral possuem uma menor atividade antimicrobiana, (Joo, Fu e Otto, 2016). Os peptídeos em folha β também precisam manter sua anfifilicidade, geralmente seguindo um modelo ($X^1Y^1X^2Y^2$) em sua estrutura primária, onde X resíduos hidrofóbicos e Y hidrofílicos.

1.3.3. Anfifilicidade, hidrofobicidade e ângulo polar

A anfifilicidade é a capacidade de uma molécula interagir com meios tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, devido à existência de regiões distintas, polares e não polares. As cadeias peptídicas se organizam espacialmente distribuindo os resíduos de aminoácidos nas devidas regiões formando as estruturas secundárias. Pela característica anfifílica da bicamada lipídica, essa característica se torna essencial para a interação entre peptídeo e membrana (Pirtskhalava, Vishnepolsky e Grigolava, 2013).

Para se aferir a anfifilicidade Eisenberg, Weiss e Terwilliger (1982) definiram o conceito de momento hidrofóbico, correlacionando as estruturas em α -hélice e em conformação- β . Nesse trabalho é proposto a quantificação da anfifilicidade utilizando a sua projeção em “helical wheel” (ou “roda helicoidal” em português) que mostra a separação das cargas em um peptídeo em α -hélice. O cálculo para um peptídeo com N resíduos correlaciona a energia livre de transferência para um meio apolar com o ângulo (α) correspondente a periodicidade da estrutura. Caso o ângulo polar seja baixo significa que as diferentes cargas

são igualmente distribuídas pela estrutura, caso seja alto há a agregação de cargas em uma região da estrutura, podendo assim se relacionar com a anfifilicidade.

A hidrofobicidade de um peptídeo é a capacidade de partição entre um meio aquoso e uma fase apolar e a energia livre de transferência entre as duas. A hidrofobicidade média do peptídeo normalmente é avaliada pela soma das energias livres de transferência entre fases de cada resíduo de aminoácido que forma a cadeia. Esse parâmetro ajuda a entender a conformação e estabilização espacial da cadeia em eventos biológicos como a sua interação com membrana (Pirtskhalava, Vishnepolsky e Grigolava, 2013).

Dos parâmetros descritos até agora, o ângulo polar é o que se tem menos informações, sendo indicado apenas uma correlação entre o ângulo e a permeabilidade da membrana (Uematsu e Matsuzaki, 2000). Sendo uma importante característica para o entendimento das interações peptídeo-membrana, pode ser um dos fatores essenciais para a predição dos mecanismos de ação de AMPs. Em seu trabalho Uematsu e Matsuzaki (2000) sintetizaram dois peptídeos com propriedades físico-químicas similares se utilizando o modelo minimalista variando apenas o ângulo polar, um com 100 graus e o outro com 180 graus. Com a diminuição do ângulo polar foi evidenciado uma maior taxa formação de poros, resultando um aumento da taxa de translocação do peptídeo. Contudo também foi observado uma menor estabilidade do poro, sendo necessário ponderar a acentuação desse parâmetro.

1.3.4. Comprimento

O tamanho dos peptídeos é também uma de suas características centrais. Intimamente interligado com os parâmetros anteriores (Zelezetsky e Tossi, 2006), o comprimento de um peptídeo pode ser visto como uma característica limítrofe no desenvolvimento de novos AMPs. No *Antimicrobial Peptide Database* (APD), mais de 95% dos peptídeos registrados possuem 50 resíduos de aminoácidos ou menos (Wang, 2004), refletindo uma tendência, tanto natural quanto econômica. Cadeias peptídicas naturais muito grandes costumam conter fragmentos redundantes ou não-ativos, sendo apenas uma parte responsável por sua atividade (Ong, Wiradharma e Yang, 2014). Para a indústria é de grande interesse trabalhar com cadeias menores, para que tenha uma produção mais barata e eficiente.

Quando tratamos do tamanho mínimo dos peptídeos temos limitações intrínsecas a sua conformação e ao mecanismo de atuação. Peptídeos em folha β são capazes de adotar uma estrutura anfifílica quando compostos de cadeias polipeptídicas de até 8 resíduos de

aminoácidos (Bahar e Ren, 2013), um comprimento mínimo da faixa de 22 à 12 resíduos é necessário para a estruturação de peptídeos em α -hélice (Mishra *et al.*, 2017). Há estudos de peptídeos-modelo com estrutura helicoidal compostos de cadeias menores, contudo apresentam ainda baixa atividade.

Uma vantagem que pode ser relacionada a diminuição do tamanho do peptídeo também é a diminuição da toxicidade, como visto no trabalho de Ciornei e colaboradores, onde é apresentado duas das cadeias menores, derivadas do AMP LL-37 possuem menor toxicidade que o peptídeo parental. Outros exemplos também podem ser observados, como no caso do HP-A3 (análogo do HP(2-20), peptídeo derivado da proteína ribossomal da *H. Pylori*) que ao retirar a porção *N*-terminal não estruturada houve uma significativa diminuição de sua toxicidade sem atrapalhar na atividade antimicrobiana (Park *et al.*, 2007).

1.4. Mecanismo

O grupo de moléculas denominado peptídeos antimicrobianos, mesmo possuindo uma finalidade comum, é heterogêneo. Por conta dessa vasta gama de moléculas, diferentes modelos foram propostos para tentar explicar a capacidade inibitória de microrganismos por AMPs. Indubitavelmente a interação com a membrana é parte crucial dos mecanismos de ação, os quais podem levar a sua desestruturação e também a interrupção de eventos fisiológicos associados a membrana (como a divisão celular), ou mesmo a interação com alvos dentro do citoplasma (Fjell *et al.*, 2012). Os mecanismos de ação de AMPs podem ser, de maneira geral, subdivididos em mais duas etapas: a inserção do peptídeo na membrana e o recrutamento crescente de novos peptídeos.

A interação peptídeo-membrana ocorre, inicialmente, por meio da atração eletroestática. A membrana bacteriana está estruturada de forma que a superfície externa tem uma alta população de cargas negativas, dessa forma os peptídeos positivamente carregados são atraídos à superfície da membrana. Uma vez que é atingida uma concentração crítica, os peptídeos induzem uma transição de fase nas membranas. Nessa etapa, por conta da interação com a interface bifásica, os peptídeos em α -hélice se estruturam formando α -hélices anfífilas (Yeaman, 2003). Também temos evidências que apontam que alguns peptídeos, uma vez integrados a membrana, tem a capacidade de se auto-associarem. O tamanho do peptídeo também está intimamente ligado a essa interação peptídeo-membrana, pois um

número de pelo menos 7 a 8 aminoácidos são necessários para a formação da estrutura anfifílica (Bahar e Ren, 2013).

A partir desse ponto existem diferentes modelos de ação que consideram as características físico-químicas advindas das estruturas primárias e secundárias peptídicas: O Barrel-Stave, o toroidal e o “carpet-like” (Yeaman, 2003).

O mecanismo barrel-stave (figura 4.A) descreve a formação de poros na superfície celular. Nesse modelo, monômeros do peptídeo irão se ligar sofrendo uma mudança conformacional de forma que a sua porção hidrofóbica interaja com a membrana e a parte hidrofílica continue direcionada para a parte exterior. O modelo recebe esse nome, pois esse primeiro monômero é comparável a uma das tábuas de madeira para criação de um barril, do inglês stave. Quando o limiar de concentração é alcançado, mais monômeros irão se agregando a essa estrutura formando um poro na estrutura da membrana, levando a sua desestruturação (Yeaman, 2003). Nesse modelo, para que consiga atravessar toda a membrana e formar o poro, o peptídeo em α -hélice precisa ser constituído de aproximadamente 22 resíduos de aminoácidos (Bahar e Ren, 2013).

No modelo toroidal (Figura 4.C) também há a formação de poros, como no barrel-stave, contudo o peptídeo induz uma deformação na curvatura da membrana, causando uma ruptura e a formação dos poros (Yeaman, 2003). Por conta da necessidade de atravessar a bicamada lipídica também é necessário que um peptídeo em α -hélice tenha um número considerável de aminoácidos, sendo 19 o quantidade mínima encontrada (Ong, Wiradharma e Yang, 2014).

Pequenos AMPs em α -hélice também são encontrados na literatura, sendo reportados alguns exemplares com 13 a 12 resíduos de aminoácido e tentativas de reduzirem até 8 resíduos (Mishra *et al.*, 2017). Para esses peptídeos, em geral, pode se aplicar o modelo “carpet-like” (figura 4.B). Nesse caso os peptídeos também interagem com a membrana por meio de interações eletroestáticas, mas agem de maneira difusa, permeando uma região como um carpete. Quando o limiar de concentração de peptídeos é atingido em uma região, acabam por interferir na fluidez da bicamada lipídica causando microfissuras em sua superfície que podem acarretar a lise celular. Diferente dos outros modelos, não há formação de uma estrutura de poro bem definida, sendo a nova conformação, energeticamente instável, a causa da interrupção celular (Yeaman, 2003).

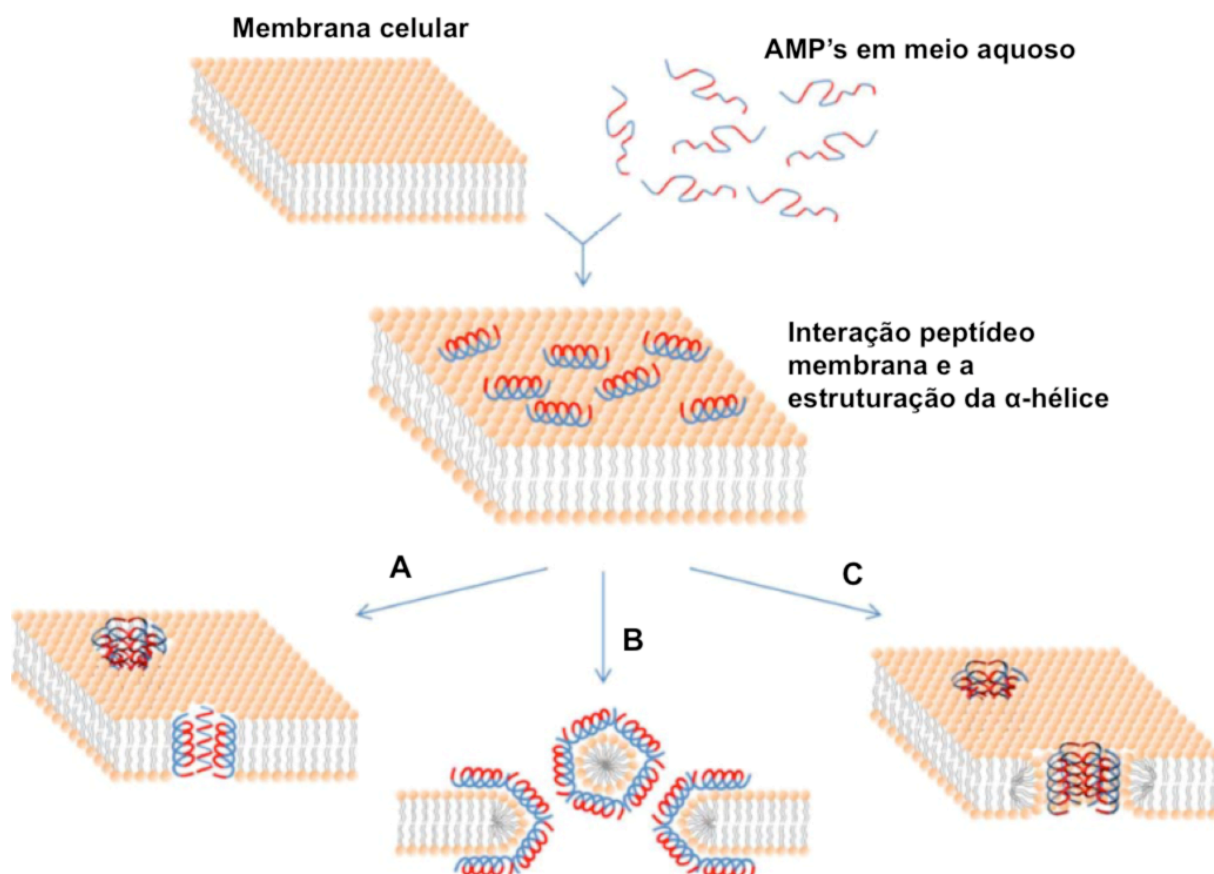


Figura 4. Figura esquemática de alguns dos principais mecanismos de AMP's membrano-ativos. A) Modelo Barrel-Stave. B) Modelo "Carpet-like". C) Modelo toroidal. Imagem adaptada e traduzida de (Bahar e Ren, 2013).

1.5. Interesses e desafios: trabalhando com o Hs02

Como descrito anteriormente, o software de prospecção Kamal é capaz de encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana encriptados em proteínas. As prospecções realizadas por esse software evoluem juntamente com o refino dos parâmetros pré-estabelecidos, por meio de dados empíricos retirados por experimentos em membranas modelo (Brand *et al.*, 2018). Entre os diversos possíveis AMPs, temos o peptídeo Hs02, cuja publicação está em andamento.

O Hs02 é um peptídeo da série de peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAPs) derivados de proteínas humanas, advindo de uma molécula chamada miosina não convencional 1H. Sendo formado por 16 resíduos de aminoácido, é um AMP potente e de amplo espectro tendo atividade em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e diferentes fungos, tendo uma eficiência comparada a produtos comerciais (dados ainda não publicados). A sua

estrutura secundária, quando na presença membrana modelo, é bem definida, apresentando a forma helicoidal e apresenta um dobramento característico de α -hélice dos resíduos Ala³-Phe¹⁴. Os resíduos de Arg e Lys são os principais responsáveis para o caráter anfifílico e constituem a face catiônica. Contudo foi constatado que no *N*-terminal o Trp² – mesmo sendo um resíduo hidrofóbico – pode interagir com a membrana por ligações π por meio de sua cadeia lateral, podendo estar tanto na face catiônica quanto na face hidrofóbica do peptídeo, com possível influência em sua atividade (Pirtskhalava, Vishnepolsky e Grigolava, 2013).

Neste trabalho foram idealizados três peptídeos a partir o Hs02: o Hs02 13.1, o Hs02 13.2 e o Hs02 10.0 (tabela 1). Esses peptídeos são análogos com reduções em três resíduos de aminoácidos no *N*-, *C*- e *N*- *C*- terminais, respectivamente, correspondendo a uma volta da hélice. Essas reduções tem caráter exploratório, com o objetivo de determinar o tamanho mínimo necessário para a manutenção de uma atividade antimicrobiana potente, além de apresentar novas possibilidades para a indústria, que tem como maiores desafios o caminhos a ser percorrido até sua regularização no mercado e a sua viabilidade econômica (Uhlig *et al.*, 2014).

Tabela 1. Sequência de resíduos de cadeias peptídicas, original e propostas.

Peptídeo	Sequência
HS02	KWAVRIIRKFIKGFIS
13.1	VRIIRKFIKGFIS
13.2	KWAVRIIRKFIKG
10.0	VRIIRKFIKG

Para que os peptídeos continuem sendo viáveis economicamente são necessários estudos que levem em consideração o seu meio de produção. A produção por expressão recombinante em cultura, mesmo tendo um custo baixo, necessita de extensa pesquisa para que haja um processo customizado específico para a produção de cada peptídeo, além do intenso processo de purificação subsequente (Kaspar e Reichert, 2013). Em contrapartida, a síntese química dos peptídeos já é bem definida. Peptídeos menores podem ser sintetizados em solução, sendo o meio preferível industrialmente por ser possível a produção massiva do material (Uhlig *et al.*, 2014). Contudo, a técnica de síntese em fase sólida tem ganhado destaque por ser mais rápida, potencialmente mais barata e ter produtos mais puros que as formas anteriores, principalmente agora que novos equipamentos tem permitido o aumento da escala de síntese.

Os maiores de custo de fabricação de novos peptídeos são os solventes utilizados na síntese e na purificação e o valor dos reagentes; sendo que peptídeos com cadeias maiores que 30 aminoácidos apresentam um desafio e devem ser abordados com cautela, por conta do seu custo final (Kaspar e Reichert, 2013). Por esses motivos diversas pesquisas são realizadas para a diminuição do peptídeo. Um peptídeo menor corresponde a: técnicas de síntese mais baratas, menor volume de solventes, menor variação das espécies de aminoácidos utilizados na síntese e maior facilidade na caracterização; refletindo menores custos (Kaspar e Reichert, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1.Geral

- Otimizar a estrutura peptídica do IAP Hs02 preservando a sua atividade antimicrobiana com a redução de resíduos de aminoácidos nas porções *N*-, *C* e *N C* terminal, visando uma diminuição de custos em uma eventual síntese desse peptídeo em larga escala para a indústria farmacéutica.

2.2.Específicos

- Sintetizar os peptídeos derivados do Hs02 por síntese de peptídeos em fase sólida;
- Purificar as amostras sintetizadas por RP-HPLC (*Reversed phase high performance liquid chromatography*; cromatografia líquida de alta eficiência, em português);
- Corroborar a estrutura primária pelo método de espectrometria de massa;
- Realizar teste de atividade antimicrobiana como MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*; Concentração inibitória mínima, em português) em diferentes organismos.

3. MÉTODOS

3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida

Uma vez selecionados os candidatos – HS02 13.1, HS02 13.2 e HS02 10.0 – modificados do peptídeo parental HS02 foram sintetizados por meio de síntese em fase sólida (SPPS, do inglês “Solid Phase Peptide Synthesis”), procedimento simplificado pelo esquema a seguir.



Esquema 2. Resumo sequencial de procedimentos para a realização da SPPS.

3.1.1. Preparação da síntese

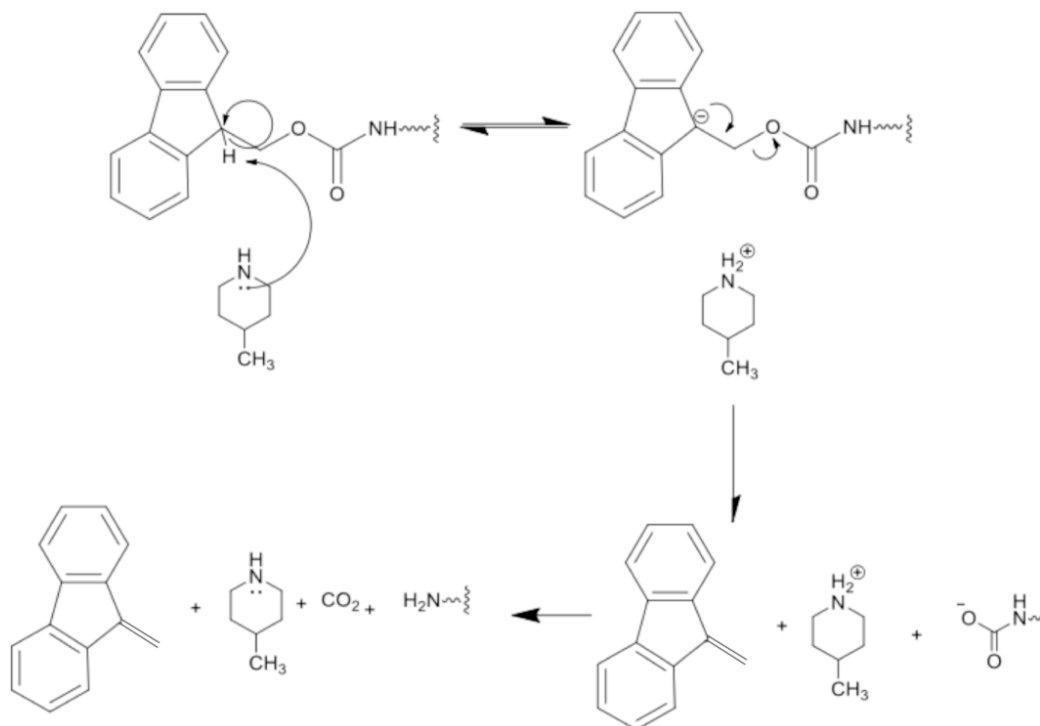
As sínteses utilizaram a resina Rink Amide 0,70 mmol/g. Para que fosse feito em uma escala de 0,15 mmol foram pesado 0,2143 g do material que então foi colocado em agitação estando completamente submerso a diclorometano por um período de 30 minutos, como já protocolado por W. C. Chan e P.D. White (Chan e White, 2000). Em seguida a resina foi lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM).

3.1.2. Desproteção

A desproteção é realizada para que haja a remoção do grupo protetor, neste caso o Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonil), do grupamento *N*-terminal. Após o procedimento anterior a resina é desprotegida utilizando uma solução 1:4 de 4-metilpiperidina em DMF. A resina ficará sobre agitação por duas séries de 15 minutos, onde a solução de 4-metilpiperidina em DMF deverá ser substituída. Após a desproteção o produto será lavado três vezes alternadamente com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM).

A síntese de peptídeos baseada no Fmoc como grupo protetor é amplamente estudada e implementada por permitir condições mais amenas de reação (King, Fields e Fields, 1990). Mesmo com a desvantagem de produzir subprodutos não voláteis e reativos, por conta da utilização de uma base orgânica, esse problema é facilmente contornável na síntese em fase sólida pela simples lavagem do produto (Chan e White, 2000).

O mecanismo da reação de desproteção é uma β -eliminação onde a desprotonação do anel fluoreno é a etapa determinante da reação, levando a um intermediário que rapidamente forma uma dupla ligação e liberando a parte aromática.



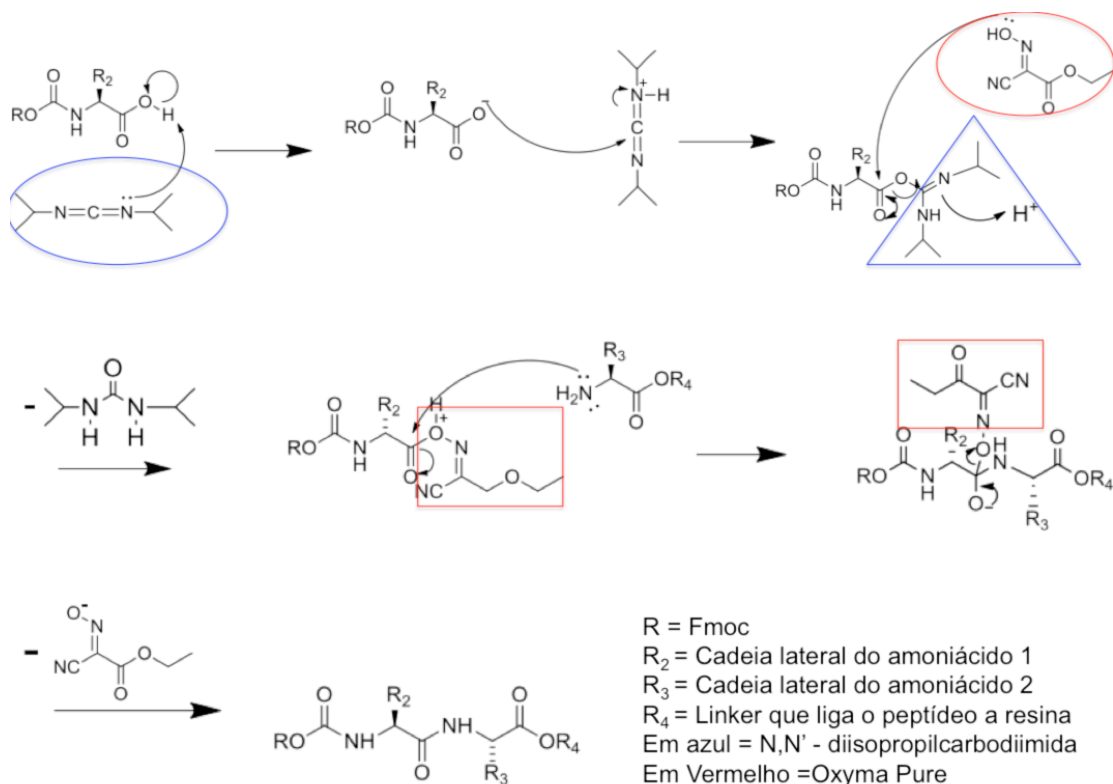
Esquema 3. Reação de retirada do Fmoc do *N*-terminal. Retirado e adaptado de Chan e White, 2000.

3.1.3. Acoplamento

Nesse trabalho o método utilizado foi a reação com carbodiimidas na presença de Oxyma Pure (acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)) (DIC/Oxyma) por possuir grande eficiência de acoplamento e ser mais seguro quando comparável a outras abordagens.

O acoplamento envolve o ataque do grupo amino da cadeia peptídica desprotegida ao grupo carboxi do reagente, formando uma ligação peptídica. Para que a reação ocorra é necessário formação de um precursor reativo, transformando aminoácido que será acoplado em um éster de aminoácido para que favoreça um ataque nucleofílico da amina.

Como dito anteriormente, a síntese foi feita para uma quantidade de 0,15 mmol. Uma quantidade correspondente a quatro equimolar de Oxyma Pure (85,3 mg) e aminoácido é adicionada ao meio reacional. Em seguida um volume de 2 mL de DMF são adicionados. Após a solubilização da fase sólida são adicionados 93µL do reagente de acoplamento DIC (N,N' – diisopropilcarbodiimida). O meio reacional devera ficar durante 1 h e 30 min sobre constante agitação. Após o acoplamento o produto será lavado três vezes alternadamente com DMF e DCM.



Esquema 4. Reação de acoplamento utilizando DIC/Oxyma. Retirado e adaptado de Sá, 2018.

3.1.4. Teste de Kaiser

É necessário um acompanhamento constante das reações de desproteção e de acoplamento. Uma reação mal sucedida pode gerar subprodutos não desejados diminuindo drasticamente o rendimento da reação e/ou inviabilizando a sua separação pela técnica de HPLC. Por isso após de cada acoplamento e cada desproteção é necessário averiguar. O teste de Kaiser é um teste qualitativo que indica a presença de aminas livre no meio, formando grãos de cor azul escura caso haja aminas livres presentes.

Para a realização do teste é necessário a preparação de três soluções: 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 ml 0,001 m KCN em 98 ml de piridina). Grãos da amostra são coletado e submersos na mistura das soluções (duas gotas de cada) que será aquecida em uma temperatura de 120 °C por poucos minutos.(Chan e White, 2000)(Protocolo 13A). O resultado deverá positivo após a desproteção e negativo após o acoplamento.

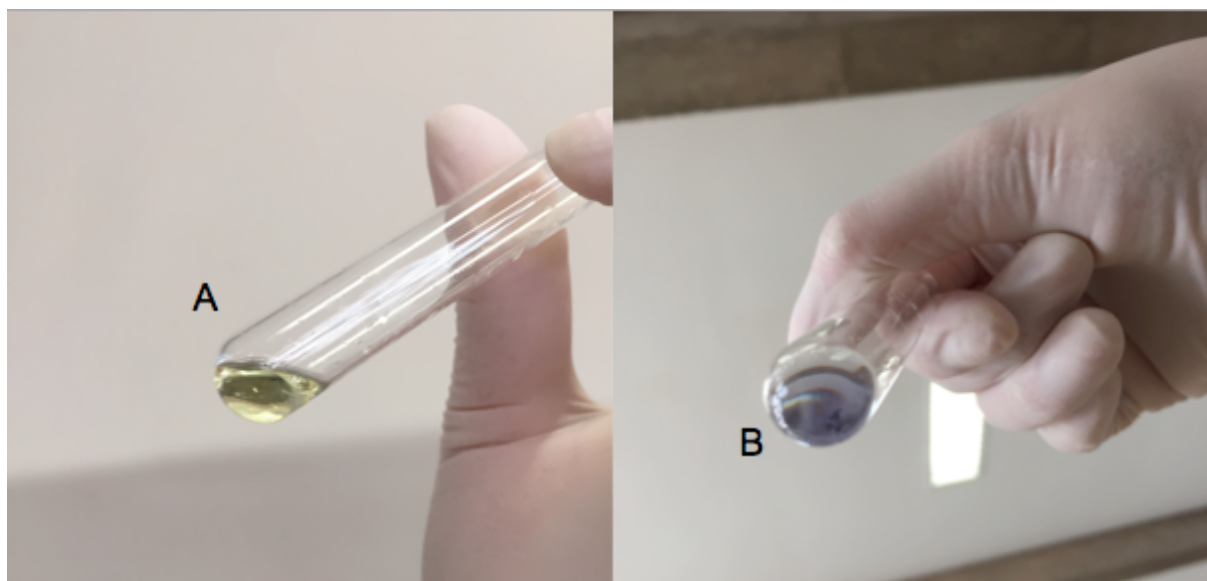


Figura 5. Resultados do teste de Kaiser: A. Negativo, não há a mudança de cor. B. Positivo, apresenta cor arroxeada.

3.1.4.1. “Capping”

Quanto maior a cadeia peptídica menos efetiva é a taxa de acoplamento de um aminoácido. Efeitos como agregação podem dificultar a inserção de um novo aminoácido a sequência levando a formação de uma sequência deletéria. Se o teste de Kaiser, mesmo depois

tentar reacoplar, der resultados levemente positivos é recomendável a utilização da estratégia de “capping” ou arrematar (Amblard *et al.*, 2006). Essa estratégia é realizada utilizando um grande excesso de um derivado de ácido desimpedido (anidrido acético) e uma base (DIPEA (N,N-diisopropiletilamina) ou piridina.

Um excesso de 50 equimolar anidrido acético e a base são dissolvidos em DMF e adicionados ao meio reacional junto ao peptídeo. A reação deve ficar em agitação por sete minutos. Após o procedimento produto será lavado três vezes alternadamente com DMF e DCM. Um novo teste de Kaiser será realizado.

3.1.5. Clivagem

Os peptídeos fixados por resinas triaioxibenzil-amina são geralmente clivados com a utilização do ácido trifluoroacético (TFA). Nessas mesmas condições básicas também é possível remover os grupos protetores de cadeia lateral dos aminoácidos. Contudo a nesse processo são gerados espécies catiônicas reativas que podem reagir novamente com a cadeia fazendo-se necessária a adição de espécies catadoras que iram aprisionar essas espécies ativas.

O Coquetel de clivagem é composto de: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 8,25:0,5:0,5:0,25 (v/v)(Chan e White, 2000). Após a última desproteção o peptídeo é adicionado coquetel e ficará sobre agitação durante 1 h 30 mins. Em seguida o excesso de TFA é retirado utilizando um fluxo de gás inerte. O produto é lavado com éter di-isopropílico gelado em um funil com vidro sinterizado em pressão reduzida. O peptídeo é filtrado logo após a lavagem utilizando uma solução de água milli-Q/acetonitrila na proporção 1:1, que será posteriormente liofilizado.

3.2. Purificação de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência

A purificação dos peptídeos foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, FM-UnB, por Cromatografia Líquida de Alta eficiência, em fase reversa, utilizando a coluna preparativa C-18 com o monitoramento dos comprimentos de onda: 216 nm (referente a absorção da ligação peptídica) e 280 nm (relacionado as existência de estruturas aromáticas nas cadeias laterais), perante o gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v) (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min : 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min: 100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). O material foi re-solubilizado em água + 0,1 TFA em uma

concentração de 20 mg/mL, antes de realizar as injeções. As frações foram coletadas e posteriormente liofilizadas.

3.3. Análise dos peptídeos por espectrometria de massa

As frações recolhidas do HPLC foram liofilizadas na Universidade Católica de Brasília e levadas para a análise por espectrometria de massa para que fosse possível identificar a fração que se encontra o material desejado e corroborar a sua estrutura primária.

As frações foram identificadas com base na razão massa/carga esperada dos peptídeos sintetizados utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Speed, Bruker) da Universidade Católica de Brasília. Para a preparação da matriz foi pesado 2 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico que foi adicionado um meio contendo 110 uL de acetonitrila, 88 uL de água Milli-Q e 22 uL de TFA 3%, para a solubilização da matriz formando uma solução 10 mg/ml em 0,3 (v/v) TFA. Cada um dos peptídeos foi aplicado na placa de MALDI junto com a matriz em uma proporção 1:3 e secos em temperatura ambiente. Com o espectrômetro previamente calibrado os produtos foram analisados em modo refletor positivo. As frações com íons correspondentes a os peptídeos de interesse foram fragmentados, técnica LIFT, para que seja feito o sequenciamento.

3.4. Quantificação

Os peptídeos purificados foram ressuspensos em água ultrapura e foram quantificados utilizando a técnica de espectrometria de absorção UV-Vis, utilizando a seguinte equação:

$$[CP] (\mu\text{g.mL}^{-1}) = [(X+Y) \times FD] / 2$$

$$X = A_{205} \times 31 \text{ (Scopes, 1974)}$$

$$Y = (A_{215} - A_{225}) \times 144 \text{ (WADDELL, 1956)}$$

[CP] – Concentração do peptídeo

FD – Fator de diluição;

A_x – Absorbância obtida no espectrofotômetro à x nm, em uma cubeta de 1 cm

Por possuir um resíduo de triptofano, o peptídeo Hs02 13.2 foi quantificado pelo coeficiente de extinção molar, seguindo a fórmula:

$$[CP] \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (A_{280} \times FD \times MM) / \epsilon \text{ (Kirschenbaum, 1978)}$$

MM – Massa molecular do peptídeo

ϵ – Coeficiente de extinção molar à 280 nm, em cubeta de 1 cm. (Triptofano = 5550 M⁻¹ cm⁻¹;))

Em seguida foram congelados e até a sua utilização para os testes antimicrobianos.

3.5. Determinação de concentração inibitória mínima

O parâmetro utilizado para avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos análogos a o Hs02 foi a sua concentração inibitória mínima (MIC, do inglês minimal inhibitory concentration). Nesse ensaio foram seguidos os protocolos M7-A10 e M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute – (CLSI, instituto de padrões clínicos e laboratoriais, em português).

Diferentes concentrações dos peptídeos (de 128 – 0,5 µM, concentração final) foram incubados juntos com as células ([bactérias] = 5x10⁵ células.mL⁻¹; [leveduras] = 2,5x10³ células.mL⁻¹ e [fungos] = 2,5x10³ células.mL⁻¹), em meio de cultura líquido, seguindo os protocolos a cima citados. O peptídeo Hs02 foi utilizado como controle negativo (não havendo crescimento) e para fins comparativos. Os microrganismos foram colocados em poços contendo apenas meio de cultura, servindo como controle positivo (há crescimento dos organismos). Além disso, como controle para do meio de cultura, foram colocados poços sem peptídeo ou microrganismo, para garantir sua esterilidade.

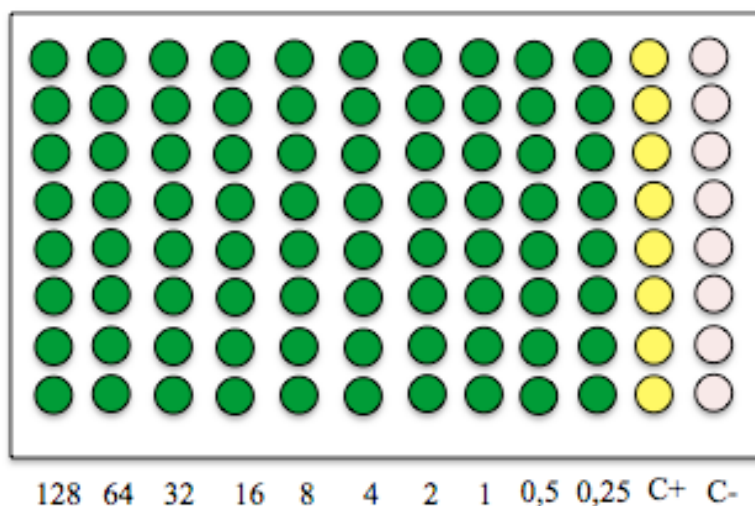


Figura 6. Imagem representativa da placa de elisa do ensaio de MIC. Sendo os números a concentração em micromolar, C+ = poços sem peptídeos e C- = poços sem peptídeo e sem microorganismos.

O teste foi realizado junto com o Professor Marcelo Ramada do Laboratório de Análise de Biomoléculas, programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnológicas da Universidade Católica de Brasília em triplicatas biológicas com os seguintes microrganismos: *S. aureus* ATCC 29223, *E. coli* ATCC 29222, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90028 e *C. neoformans* B3501. Após o período de incubação (24 h para bactérias, 48 h para *C. albicans* e 72h para *C. neoformans*) foi avaliado se houve o crescimento dos organismos em cada poço pela sua turbidez. Foi considerado o MIC a onde não foi observado crescimento de microrganismos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese de peptídeos

Os peptídeos Hs02 13.1, 13.2 e 10.0 foram sintetizados pelo método de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida. Na tabela a seguir temos a estrutura primária dos peptídeos sintetizados.

Tabela 2. Sequência de aminoácidos para a síntese dos peptídeos.

Peptídeo	Sequência peptídica
13.1	VRIIRKFIKGFIS
13.2	KWAVRIIRKFIKG
10.0	VRIIRKFIKG

Durante a desproteção não foram encontrados problemas em nenhuma das sínteses, segundo os testes de Kaiser, demonstrando a eficiência do método.

Para o acoplamento foi utilizado a reação com carbodiimidas na presença de oxyma pure (DIC/Oxyma). Foi observado um acoplamento parcial ou não acoplamento do resíduo de aminoácido na posição 5 de todos os peptídeos, que, coincidentemente, é uma Arg. Acredita-se que as causas mais prováveis desse ocorrido são: volumoso grupo de proteção presente nesse resíduo e o efeito de agregação, muito comum em cadeias maiores (Chan e White, 2000). Foram realizados re-acoplamentos com a adição de duas gotas do Triton X-100, agente dispersante inibidor do efeito de agregação (Hojo *et al.*, 2011). Resíduos posteriores também foram acoplados com a adição do Triton X-100. No peptídeo Hs02 13.1 não foi possível um acoplamento completo da Arg⁵, mesmo após tentativas sucessivas de re-acoplar. Nesse resíduo foi realizado o “capping”, técnica de proteção permanente da cadeia peptídica, evitando sequências deletérias e possibilita a sua separação do produto por métodos cromatográficos. No peptídeo Hs02 13.2 também se fez necessário reacoplar a Val⁴.

Em geral o método utilizado teve uma taxa de acoplamento satisfatória, com o problema com o efeito de agregação sendo facilmente resolvido.

4.2. Purificação dos peptídeos e caracterização da estrutura primária

Os produtos da síntese em fase sólida, após suas clivagem e liofilização, foram purificados por meio da cromatografia líquida de alta eficiência.

Os cromatogramas a seguir foram obtidos seguindo a metodologia do item 3.2.

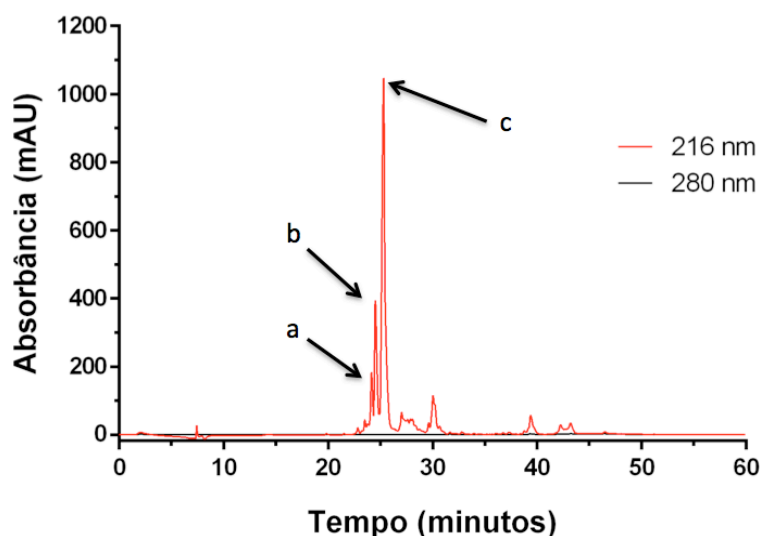


Figura 7. Cromatograma do peptídeo Hs02 13.1; eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min : 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min: 100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). Possui três picos majoritários, sendo eles aproximadamente em: a – 24 minutos, b – 24,5 minutos e c – 25 minutos.

No peptídeo 13.1 é possível observar 3 picos distintos com considerável intensidade, isso se deve a necessidade na hora da síntese de realizar a técnica de “capping” (item 3.1.4.1), por conta do acoplamento parcial da Arg⁵. O tempo de retenção permitiu a coleta individual de cada pico para que fossem analisados.

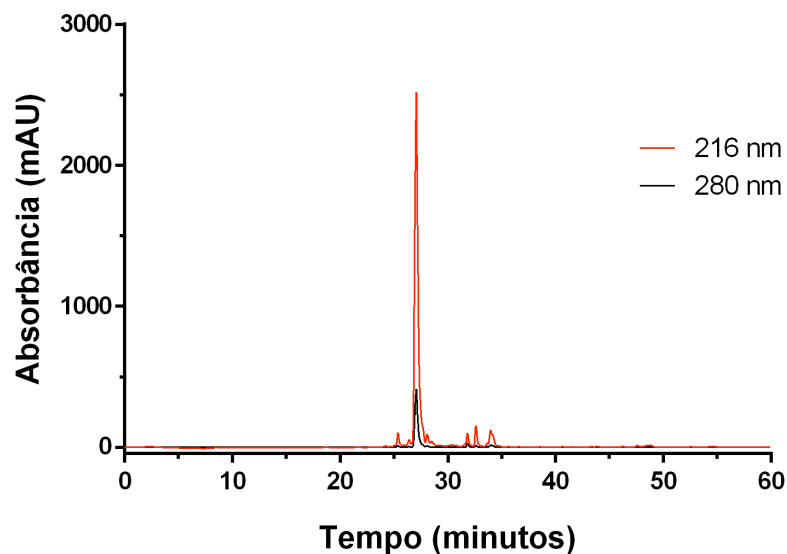


Figura 8. Cromatograma do peptídeo Hs02 13.2; eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min : 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min: 100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). Possui um único pico majoritário em aproximadamente 27 minutos.

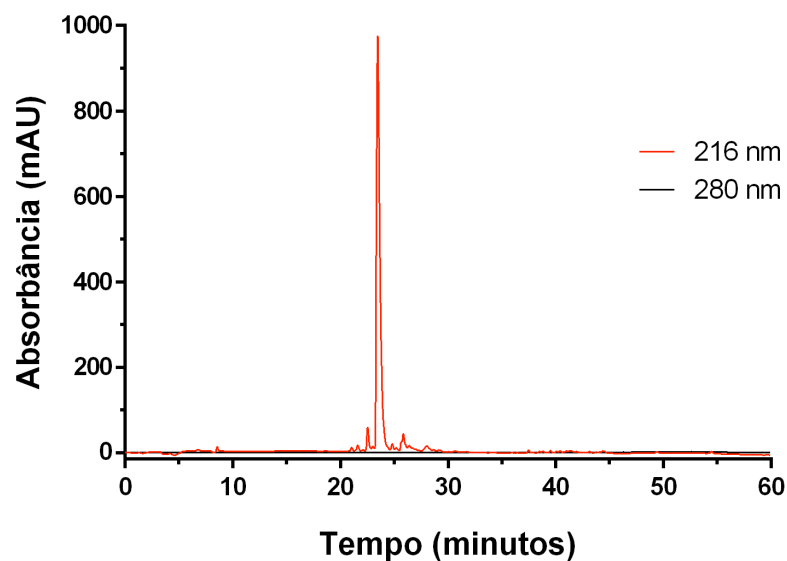


Figura 9. Cromatograma do peptídeo Hs02 10.0; eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA (0 – 5min: 5% de ACN, 5 – 55 min : 5% a 100% ACN; de 50 – 55 min: 100% de ACN; 55 – 60 min: 100% a 5% ACN). Possui um único pico majoritário em aproximadamente 24 minutos.

Os cromatogramas acima, referentes a os peptídeos 13.2 e 10.0 demonstram a eficiência e seletividade da síntese de peptídeos em fase sólida. Em nessas sínteses foi obtido um único pico majoritário e distinto, apresentando uma quantidade pouco significativa de picos decorrentes de subprodutos de síntese.

Para confirmar a estrutura primária dos análogos do peptídeo Hs02 sintetizados, primeiramente, é necessário calcular a sua massa teórica. Para isso utilizamos os valores de massa monoisotópica dos resíduos de aminoácidos utilizados na sua síntese.

Tabela 3. Massa teórica dos peptídeos.

Peptídeo	Sequência	$[M+H]^+$ (Da)
13.1	VRIIRKFIKGFIS	1576,021
13.2	KWAVRIIRKFIKG	1614,048
10.0	VRIIRKFIKG	1228,837

Em seguida foram obtidos espectros de massa correspondente as frações eluídas de cada pico majoritário dos cromatogramas.

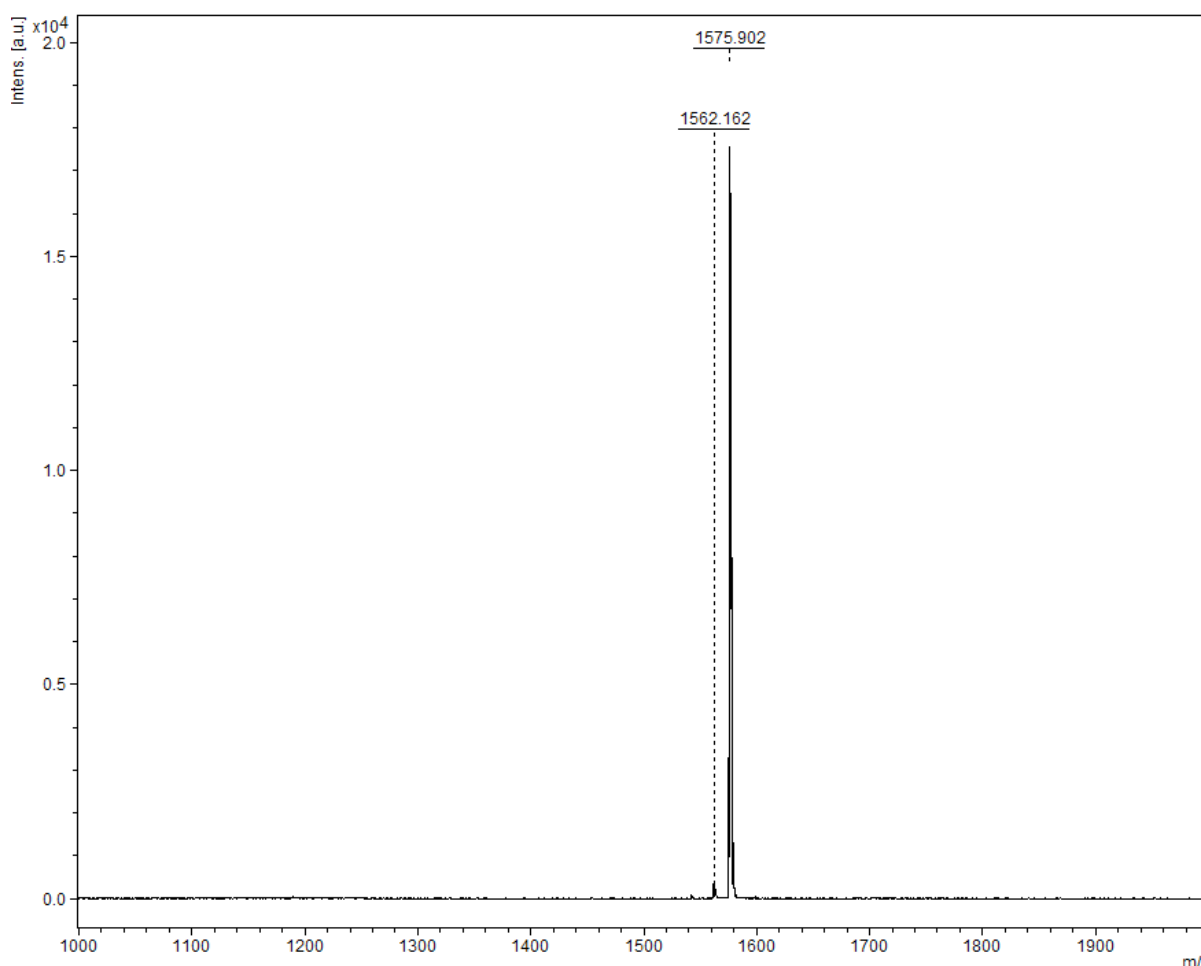


Figura 10. Espectro MS do análogo Hs02 13.1 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Speed, Bruker). Imagem na faixa de m/z 1000 a m/z 2000.

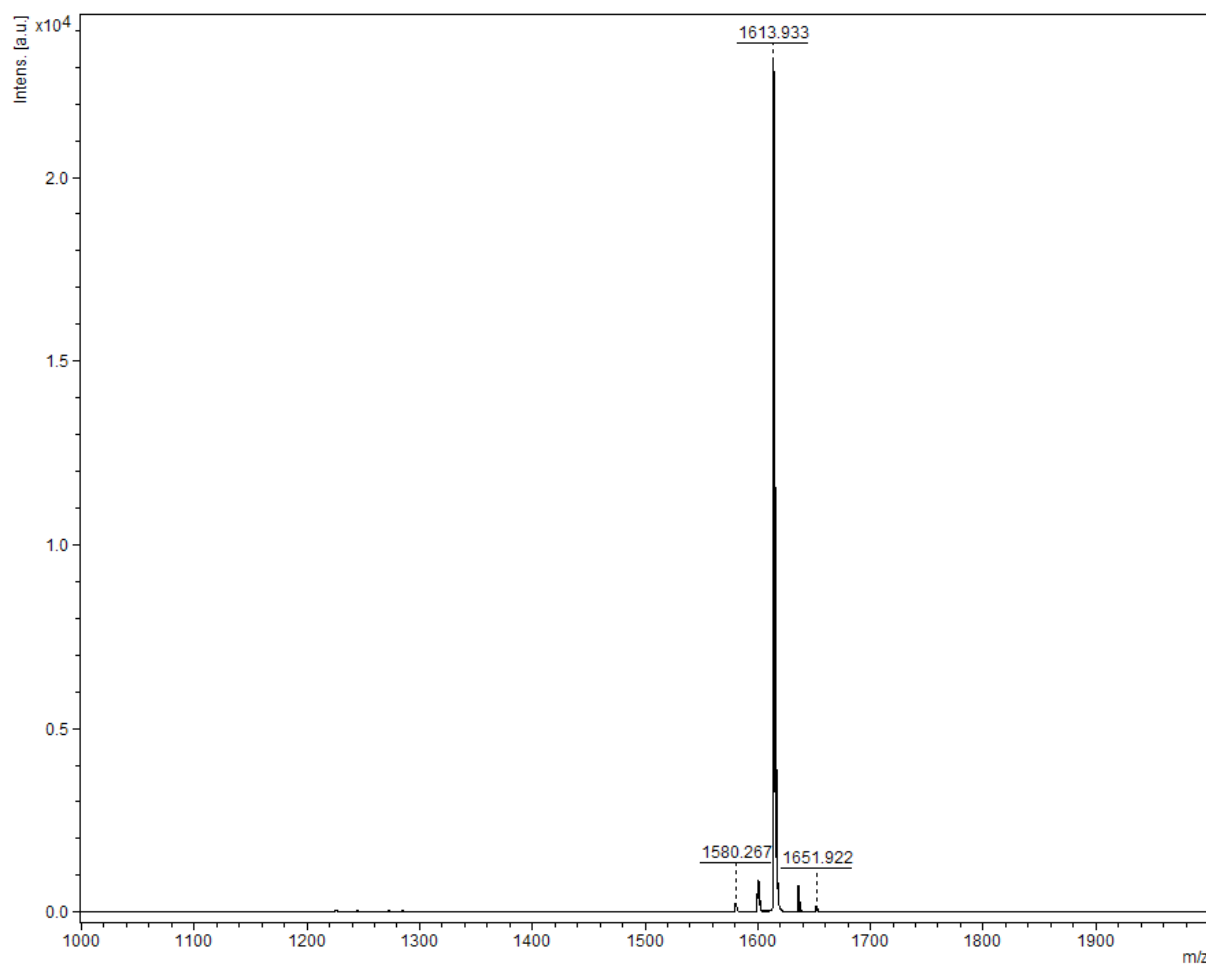


Figura 11. Espectro MS do análogo Hs02 13.2 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Speed, Bruker). Imagem na faixa de m/z 1000 a m/z 2000.

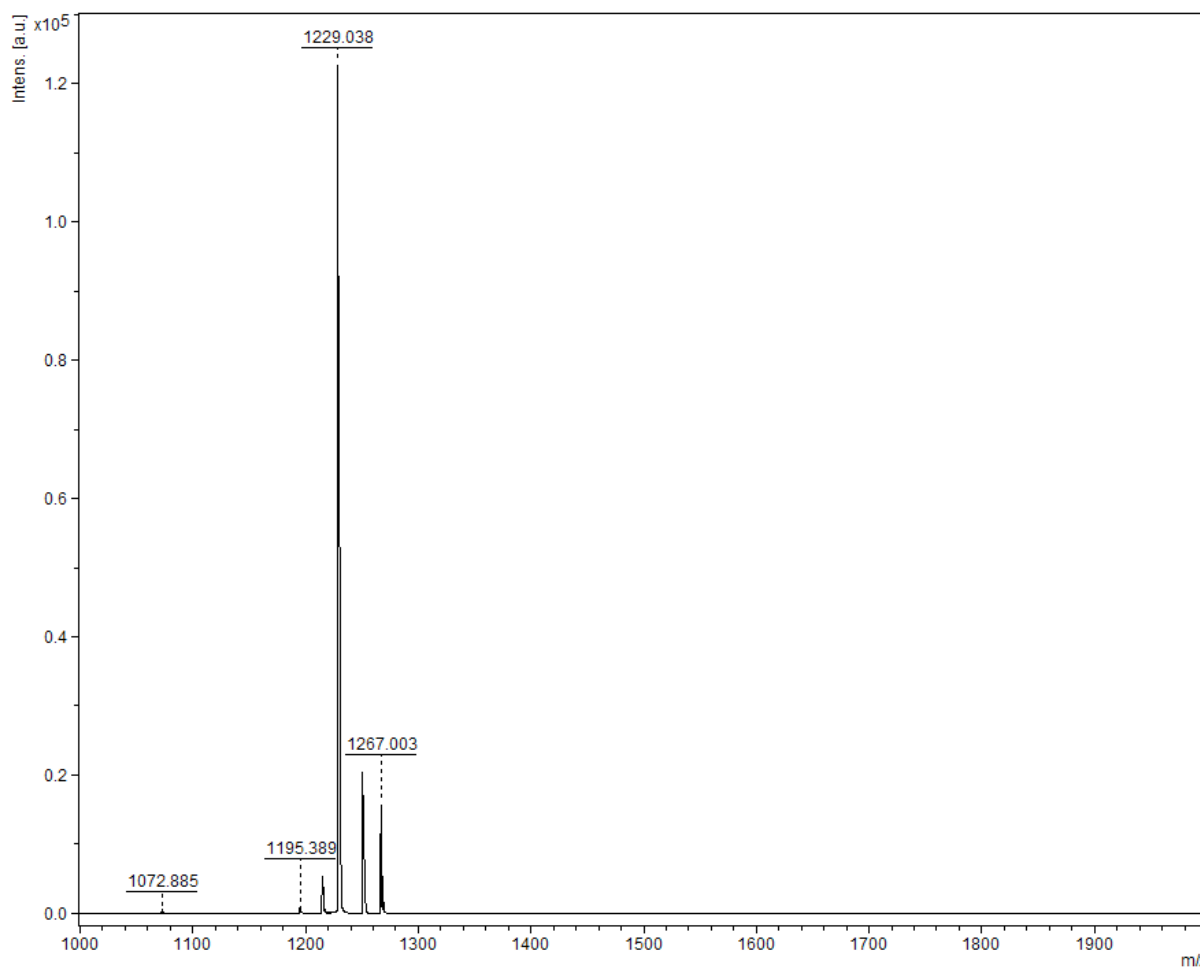


Figura 12. Espectro MS do análogo Hs02 10.0 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Speed, Bruker). Imagem na faixa de m/z 1000 a m/z 2000.

As massas experimentais foram próximas às massas teóricas dos peptídeos – como apresentado na tabela 4. Contudo, eles não foram analisados no mesmo dia, levando a uma leve variação decorrente da calibração do aparelho.

Tabela 4. Massa teórica vs massa experimental e erro em módulo.

Peptídeo	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro
13.1	1576,021	1575,902	0,119
13.2	1614,048	1613,933	0,115
10.0	1228,837	1229,038	0,201

A estrutura primária dos peptídeos foi confirmada através da fragmentação do seu íon precursor no espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF operando em modo LIFT (UltraFlex Speed, Bruker). No sequenciamento a seguir podemos ver às fragmentações na série y (na

parte superior, lido da direita para a esquerda) e na série b (na parte inferior, lido da esquerda para a direita), que confirmam a estrutura dos peptídeos sintetizados.

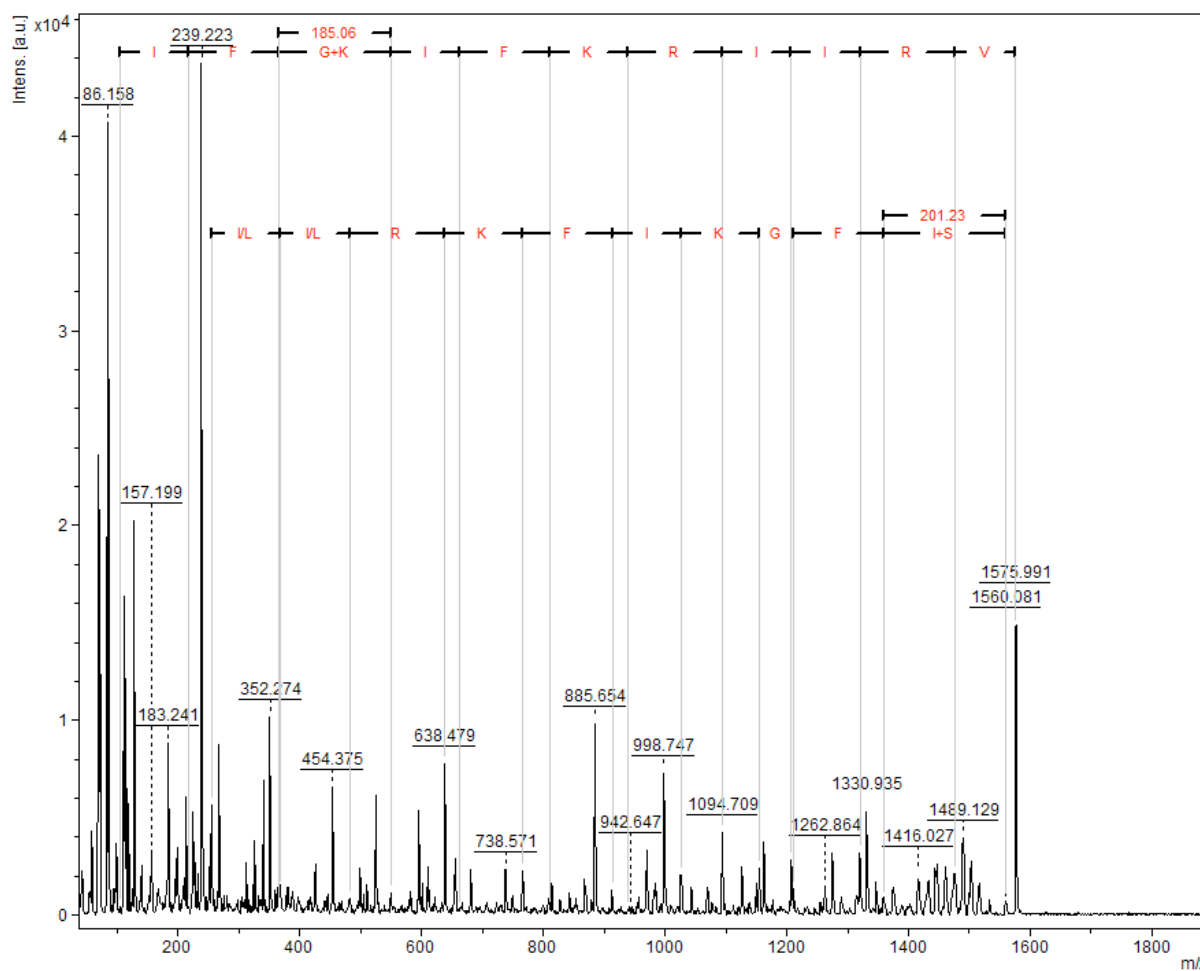


Figura 13. Sequenciamento pela fragmentação do íon feita por MALDI LIFT-TOF/TOF do peptídeo Hs02 13.1. Estrutura primária: VRIIRKFIKGFIS

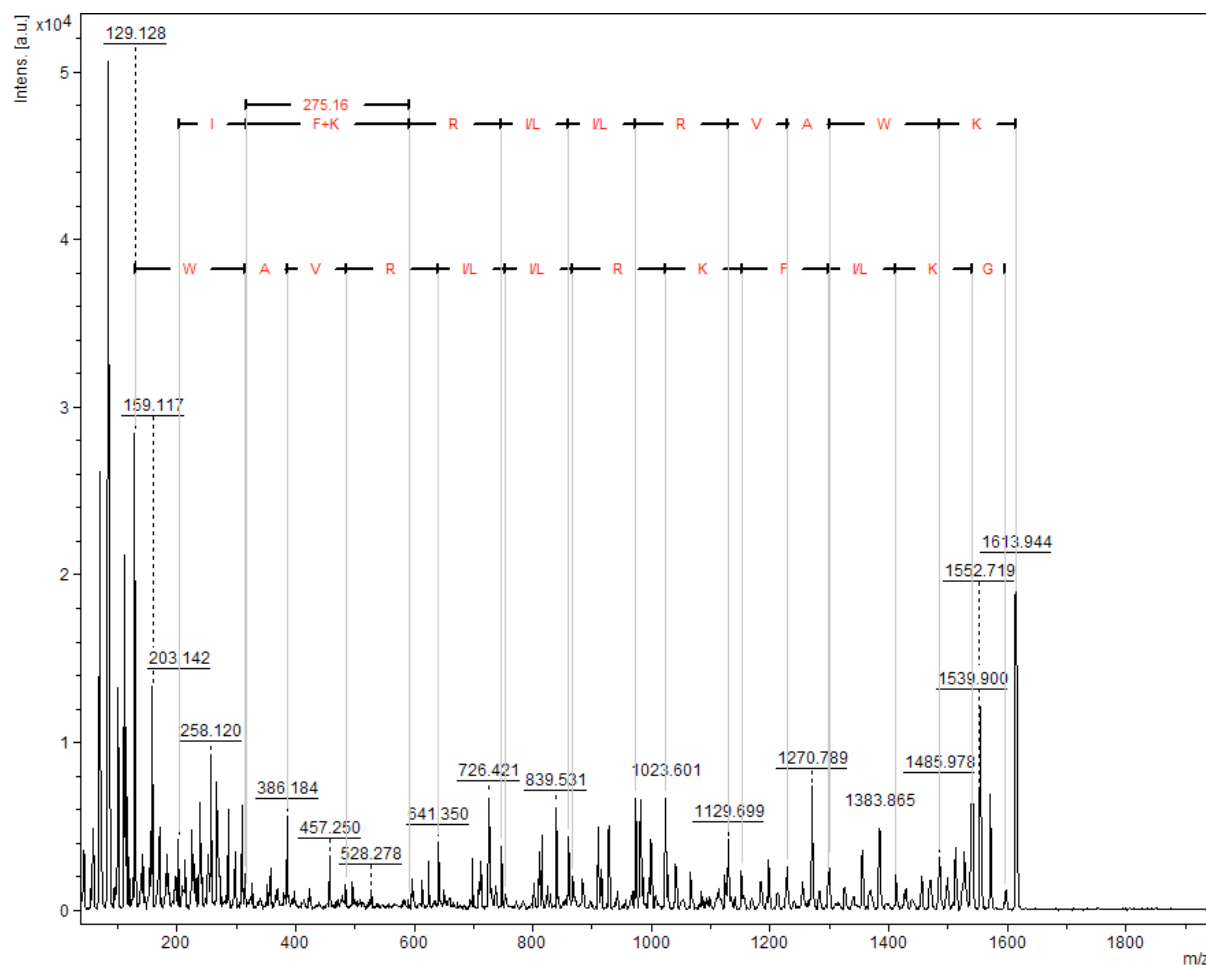


Figura 14. Sequenciamento pela fragmentação do íon feita por MALDI LIFT-TOF/TOF do peptídeo Hs02 13.2. Estrutura primária: KWAVRIIRKFIKG

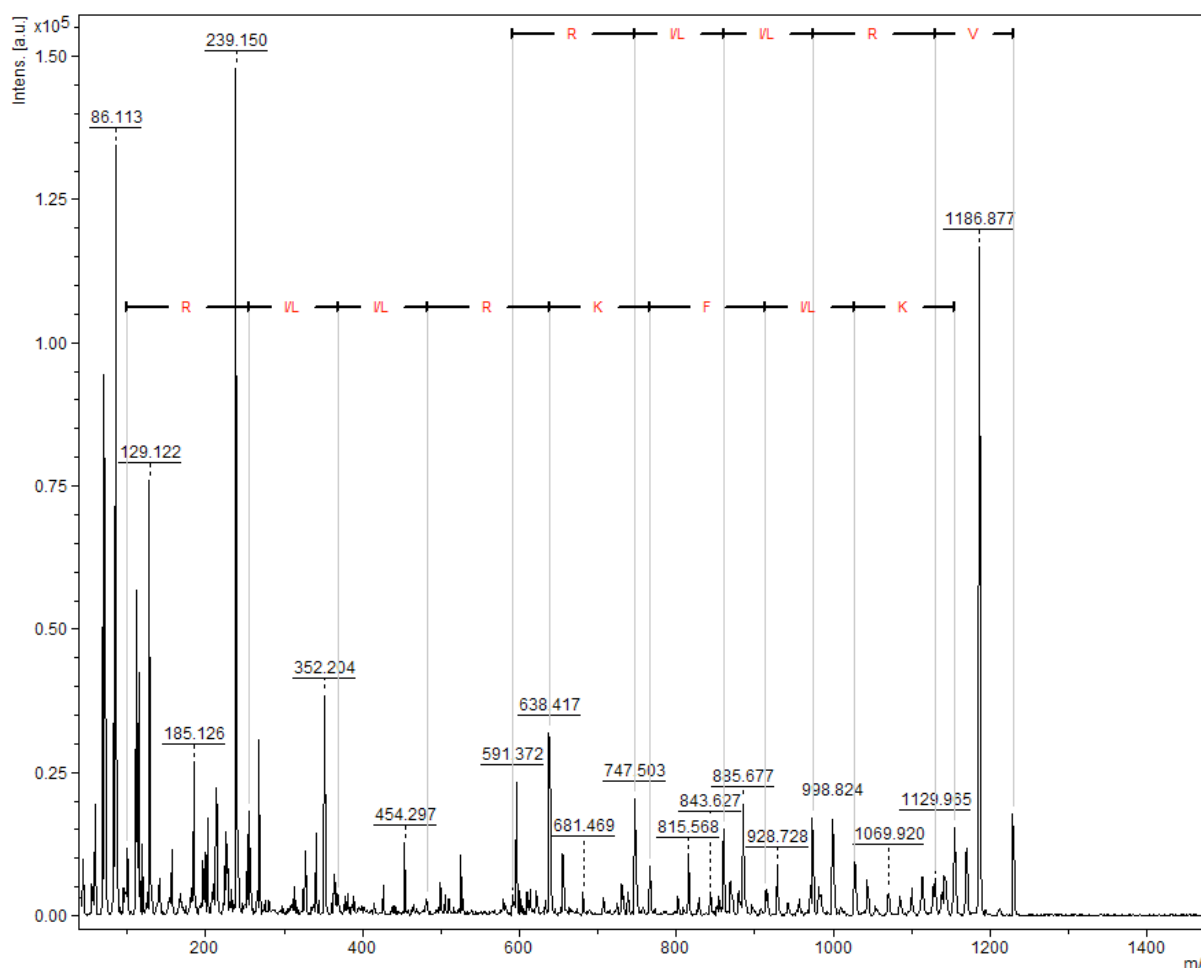


Figura 15. Sequenciamento pela fragmentação do íon feita por MALDI LIFT-TOF/TOF do peptídeo Hs02 10.0. Estrutura primária: VRIIRKFIKG

A sequência peptídica foi confirmada em todas as sínteses sendo necessário a análise de ambas as séries (y e b). Nessa caracterização é possível ver dois momentos distintos, onde em um a série y é a fragmentação majoritária (13.1= Val¹ a Iso⁴, 13.2= Lys¹ a Iso⁷ e 10.0= Val¹ a Arg⁵) e em outro que é a série b (13.1= Arg⁵ a Ser¹³, 13.2= Arg⁸ a Glu¹³ e 10.0= Lys⁶ a Glu¹⁰).

4.3. Quantificação

Após a confirmação da estrutura primária dos peptídeos sintéticos, estes foram quantificados.

Foi retirado uma alíquota de 5,1 mg do peptídeo já liofilizado para ser solubilizado em 500 µL de água deionizada. Partindo dessa solução estoque foi feito 1 mL de solução com fator de diluição 1:500.

A quantificação foi feita utilizando um espectrômetro de absorção UV/Vis e foram obtidas as seguintes absorbâncias:

Tabela 5. Comprimento de onda e absorbância associada.

Comprimento de Onda	Abs 13.1	Abs 13.2	Abs 10.0
205 nm	0,745		0,620
215 nm	0,367		0,299
225 nm	0,171		0,161
280 nm		0,075	

Utilizando os valores de absorbância, as concentrações foram calculadas utilizando as equações mostradas apresentadas no capítulo 3.4 e são:

Tabela 6. Concentração dos peptídeos em mmol.L⁻¹.

Peptídeo	Concentração (mM)
13.1	8,14
13.2	6,75
10.0	7,97

4.4.Determinação da atividade antimicrobiana dos análogos de Hs02

A atividade antimicrobiana dos peptídeos análogos ao Hs02 foi estabelecida pelo seu MIC (concentração inibitória mínima). Os testes de MIC são amplamente utilizados por sua simplicidade e resultados definitivos, podendo ser definido como: “a menor concentração de um agente que vai inibir o crescimento visível de um organismo após seu período de incubação” (Andrews, 2001).

Para o teste foram respeitados os protocolos M7-A10 e M27-A3 da CLSI, como descrito no capítulo 3.5, sendo o resultado a concentração que se encontra no último poço aonde não há o crescimento do microrganismo.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima dos peptídeos em bactérias.

<i>S. aureus</i> ATCC 29223				
Peptídeos	Concentração (µM)			Média (µM)
Hs02 13.1	64	64	64	64,00
Hs02 13.2	32	32	32	32,00
Hs02 10.0	>128	>128	>128	>128
Hs02	1	1	1	1,00
<i>E. coli</i> ATCC 29222				
Peptídeos	Concentração (µM)			Média (µM)
Hs02 13.1	16	16	16	16,00
Hs02 13.2	16	16	16	16,00
Hs02 10.0	>128	>128	>128	>128
Hs02	2	2	2	2,00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853				
Peptídeos	Concentração (µM)			Média (µM)
Hs02 13.1	32	16	16	21,33
Hs02 13.2	16	16	16	16,00
Hs02 10.0	>128	>128	>128	>128
Hs02	2	2	1	1,67

Em um primeiro momento foi explorado o MIC dos análogos de Hs02 frente a bactérias. Para isso foram selecionados três microrganismos de interesse, sendo eles: *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativas). Em todos os testes os peptídeos análogos tiveram um MIC maior do que Hs02, como mostrado na tabela 7. Para os análogos sem os 3 resíduos *N*- ou *C*- terminais (Hs02 13.1 e Hs02 13.2, respectivamente) há um decréscimo da atividade na ordem de oito a sessenta e quatro vezes, quando comparados com o peptídeo original. Além disso quando há a retirada de 3 aminoácidos de cada extremidade da molécula (Hs02 10.0), a atividade antimicrobiana é abolida, mostrando que, como descrito na literatura um tamanho de no mínimo 13 ou 12 resíduos é o mínimo possível.

Para que o houvesse continuação no estudo também foram avaliados os MIC dos peptídeos quando em frente a duas leveduras, como apresentado na tabela a seguir.

Tabela 8. Concentração inibitória mínima dos peptídeos em leveduras.

	<i>C. albicans</i> ATCC 90028			
Peptídeos	Concentração (µM)			Média (µM)
Hs02 13.1	>128	>128	>128	>128
Hs02 13.2	128	128	128	128,00
Hs02 10.0	>128	>128	>128	>128
Hs02	8	8	8	8,00
	<i>C. neoformans</i> B3501			
Peptídeos	Concentração (µM)			Média (µM)
Hs02 13.1	32	32	32	32,00
Hs02 13.2	8	8	8	8,00
Hs02 10.0	>128	>128	>128	>128
Hs02	1	1	1	1,00

Como pode ser observado o padrão se repete.

Como dito anteriormente, a diminuição do tamanho de um peptídeo é um desafio a ser enfrentado. Mesmo possuindo certa atividade antimicrobiana, os análogos sintetizados, estão muito aquém do peptídeo original. Acredita-se que isso ocorreu por ter passado do tamanho mínimo ideal para essa sequência, por trabalhar muito próximo dos limites estruturais de α -hélices, que são prejudicadas com a diminuição da cadeia, afetando a interação com a membrana (Mishra *et al.*, 2017).

O peptídeo 10.0 continua sem atividade antimicrobiana, indo de acordo com a limitação do tamanho mínimo para que um peptídeo em α -hélice possua atividade.

O peptídeo Hs02 13.1 teve um menor desempenho em alguns ensaios, quando comparados com o Hs02 13.2. A relevância do Trp² – o qual pode interagir tanto com a região hidrofóbica quanto com a hidrofílica de membranas – é observada, em consonância com a literatura (Pirtskhalava, Vishnepolsky e Grigolava, 2013) (Ong, Wiradharma e Yang, 2014). Outro fator que pode influenciar é que há a retirada de um resíduo carregado positivamente no peptídeo 13.1 afetando a sua cationicidade.

Ao observar a atividade do peptídeo 13.2 para o organismo *C. neoformans* encontramos uma aplicação promissora. Mesmo apresentando um MIC oito vezes maior assim como nos testes com a *E. coli* e a *P. aeruginosa*, a possibilidade de inibição com apenas 8 µM nos mostra um inesperado potencial antifúngico.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho proporcionou uma ampla perspectiva no âmbito de síntese e otimização de sequências peptídicas. Tendo um caráter exploratório, procurou investigar as possibilidades de otimização de sequências de interesse, no caso a Hs02. Por meio dos dados apresentados anteriormente podemos considerar a possibilidade que o tamanho ideal para o peptídeo Hs02 já tenha sido alcançado, não sendo possível a manutenção de sua atividade antimicrobiana a partir de reduções de tamanho.

A técnica e síntese em fase sólida é um método já muito bem estabelecido no meio acadêmico. A maturidade do método demonstras as suas vantagens, sendo que todos os problemas encontrados durante o seu processo de síntese rapidamente solucionados por conta da vasta literatura no assunto.

Os análogos propostos foram purificados pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e a sua sequência caracterizada pela técnica de espectrometria de massa, ambas representantes de tecnologia de ponta nas suas áreas de atuação. Os ensaios antimicrobianos realizados em parceria com a Universidade Católica, seguindo protocolos que respeitam padrões internacionais, para que haja a reprodutibilidade do processo.

O trabalho, mesmo não apresentando os resultados antimicrobianos ideais abrem portas para uma exploração mais completa do assunto. Interação com membrana modelo, investigação de sua capacidade anti-inflamatória e de sua citotoxicidade – por não serem diretamente proporcionais – além da possível exploração com diferentes análogos são apenas algumas das possibilidades a seguir a partir desse projeto.

6. REFERÊNCIAS

- ABBASSI, F. *et al.* Temporin-SHf, a new type of Phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16880–16892, 2010.
- AMBLARD, M. *et al.* Methods and Protocols of Modern Solid-Phase Peptide Synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, p. 239–254, 2006.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5–16, 2001.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **pharmaceuticals**, p. 1543–1575, 2013.
- BRAND, G. D. *et al.* Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- CHAN, W.; WHITE, P. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. [s.l.: s.n.].
- CHERKASOV, A. *et al.* Use of Artificial Intelligence in the Design of Small Peptide Antibiotics Effective against a Broad Spectrum of Highly Antibiotic-Resistant Superbugs. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 65–74, 16 jan. 2009.
- CIORNEI, C. D. *et al.* Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2845–2850, 2005.
- EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 371–374, 1982.
- FJELL, C. D. *et al.* Designing antimicrobial peptides: Form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2012.
- FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, jan. 2015.
- FOX, J. L. Antimicrobial peptides stage a comeback. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 379–382, 2013.
- HOJO, K. *et al.* Development of a method for environmentally friendly chemical peptide synthesis in water using water-dispersible amino acid nanoparticles. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 49, 2011.
- JOO, H. S.; FU, C. I.; OTTO, M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, 2016.
- KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17–18, p. 807–817, set. 2013.
- KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 36, n. 3, p. 255–266, 1990.
- KIRSCHENBAUM, D. M. Molar absorptivity and A1%/1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. v. 87, n. 1, p. 223–242, 1978.
- MISHRA, B. *et al.* Design and surface immobilization of short anti-biofilm peptides. **Acta Biomaterialia**, v. 49, p. 316–328, fev. 2017.
- NAKAMURA, T. *et al.* Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. **Journal of**

Biological Chemistry, v. 263, n. 32, p. 16709–16713, 1988.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l.: s.n.].

ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 28–45, 2014.

PARK, Y. *et al.* Structure-activity relationship of HP (2–20) analog peptide: Enhanced antimicrobial activity by N-terminal random coil region deletion. **Biopolymers**, v. 88, n. 2, p. 199–207, 2007.

PIRTSKHALAVA, M.; VISHNEPOLSKY, B.; GRIGOLAVA, M. Transmembrane and Antimicrobial Peptides. Hydrophobicity, Amphiphilicity and Propensity to Aggregation. 23 jul. 2013.

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, 2003.

RAMADA, M. H. S. *et al.* Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

SÁ, L. G. G. DE. **Prospecção, síntese e aplicação de peptídeos intragênicos antimicrobianos na conservação de alimentos**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2018.

SCOPES, R. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277–282, 1974.

SHARMA, J. N. Hypertension and the bradykinin system. **Current Hypertension Reports**, v. 11, n. 3, p. 178–181, 2009.

STRØM, M. B.; REKDAL, Ø.; SVENDSEN, J. S. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 8, p. 431–437, 2002.

UEMATSU, N.; MATSUZAKI, K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: A model peptide study. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 4, p. 2075–2083, 2000.

UHLIG, T. *et al.* The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58–69, 2014.

VRANKEN, D. VAN; WEISS, G. Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology. **Garland Science**, v. 1, 2013.

WADDELL, W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 48, n. 2, p. 311–314, 1956.

WANG, Z. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 590D – 592, 2004.

YEAMAN, M. R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 1 mar. 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 0028-0836 (Print), p. 389–395, 2002.

ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. Alpha-helical antimicrobial peptides — Using a sequence template to guide structure – activity relationship studies. v. 1758, p. 1436–1449, 2006.